

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

Fakulta textilní
Katedra materiálového inženýrství

ANALÝZA 3D VLÁKENNÝCH VRSTEV ANALYSIS OF 3D FIBROUS LAYERS

KMI - 003

Petra ZDOBINSKÁ

Vedoucí:	Ing. Vladimír Kovačič
Studijní program:	B3107 Textil
Studijní obor:	T08000532 Textilní materiály a zkušebnictví
Rozsah práce :	- rozsah práce: 57 stran
	- počet obrázků: 57
	- počet tabulek: 1
	- počet příloh: 0
Datum:	27.5.2013

Zde bude oficiální zadání práce s podpisem děkanky.

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci vypracovala samostatně a použila jsem pouze podklady (literaturu, projekty, software atd.) uvedené v příloženém seznamu.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 Zákona č. 121/2000 sb., o právu autorském o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL. V tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla až do jejich skutečné výše.

V Liberci dne

podpis:

Ráda bych vyjádřila své poděkování vedoucímu mé bakalářské práce panu Ing. Vladimíru Kovačičovi za čas a úsilí, který mi věnoval po dobu studia a v průběhu sestavování této práce.

Dále chci poděkovat Ing. Jiřímu Chvojkovi, Ing. Denise Zálešákové, Ing. Lukáši Voleskému, a Ing. Darině Jašíkové za pomoc v laboratořích a cenné rady při přípravě, analýzách a hodnocení vzorků.

Abstrakt

Obsahem práce je studium trojrozměrných vláknenných struktur s mikrometrovými, submikrometrovými a nanometrovými průřezy vláken. V současné době jsou takovéto struktury považovány za slibný materiál pro využití v biomedicínských aplikacích jako polymerní matrice, na kterých se zachycují buňky tvořící novou tkáň – tzv. scaffoldy. Trojrozměrné vláknenné struktury vyrobené z polykaprolaktonu a polyvinylalkoholu – biodegradovatelných polymerů byly vybranými metodami (metoda příčných řezů zalitých struktur v polymerní matrici, metoda přímých řezů materiálu, metoda lomů v kapalném dusíku, metoda řezání laserem) připravovány pro následné mikroskopické hodnocení. K mikroskopickému hodnocení byly použity rastrovací elektronový mikroskop a mikroskop atomových sil. Vhodná příprava vzorků a následné zhodnocení pozorované struktury slouží jako nástroj kontroly technologie přípravy trojrozměrné vláknenné struktury jak z hlediska průměrů vláken, tak jejich uspořádání. Na základě provedených experimentálních výsledků je nejvhodnějším postupem lom struktur v kapalném dusíku a jejich pozorování a následné hodnocení rastrovacím elektronovým mikroskopem.

Klíčová slova: scaffoldy, tkáňové inženýrství, polykaprolakton, polyvinylalkohol, mikroskopie.

Abstract

The aim of the thesis is the study of the fibrous structures of diameters in micro/nano scale. Such structures seem to be promising material for using in biomedical applications as scaffolds which mimic native extracellular matrix. Three dimensional fibrous structures made of biodegradable polymers such as polycaprolactone and polyvinylalcohol were studied by selected methods (method of the transversal cross sections of the materials flooded in the polymeric matrices, methods of the straight cross sections, cross sections made under the temperature of liquid nitrogen, cutting by the laser). These methods were prepared for electron and atom force microscopy. The preparation of samples and its evaluation serve as feedback for preparation of 3D fibrous structure from the point of view of fiber diameters as well as its arrangement. The cross section made in liquid nitrogen seems to be suitable method for the morphological studies by electron microscope.

Keywords: scaffolds, tissue engineering, polycaprolactone, polyvinylalcohol, microscopy.

Seznam použitých symbolů a zkratk

TEM	transmission electron microscopy (transmisní elektronová mikroskopie)
SEM	scanning electron microscopy (skenovací elektronová mikroskopie)
REM	rastrovací elektronová mikroskopie (ekvivalent SEM)
AFM	atomic force microscopy (mikroskopie atomárních sil)
PVA	polyvinylalkohol
PCL	polycaprolactone (polykaprolakton)

Obsah

Úvod	8
1. Teoretická část	
1. 1 Zákl. charakteristika trojrozměr. vlákenných vrstev a jejich význam	10
1. 1. 1 Tkáňové inženýrství	10
1. 1. 2 Požadavky kladené na tkáňové nosiče	12
1. 1. 3 Biokompatibilita a biodegradabilita	12
1. 2 Výroba trojrozměrných vlákenných vrstev	14
1. 2. 1 Materiály používané při výrobě trojrozměrných vlákenných vrstev	14
1. 2. 3 Technologie využívané pro výrobu trojrozměr. vlákenných vrstev	16
1. 3 Analýza trojrozměrných vlákenných vrstev	17
1. 3. 1 Mikroskopická hodnocení	18
2. Experimentální část	21
2. 1 Laboratorní příprava trojrozměrných vlákenných vrstev	21
2. 2 Příprava vzorků pro následná analytická hodnocení	24
2. 2. 1 Příprava vzorků pro příčné řezy	24
2. 2. 2 Příprava vzorků pro lomy v kapalném dusíku	30
2. 2. 3 Příprava vzorků pro řezy laserem	32
2. 2. 4 Příprava vzorků pro mikroskopická hodnocení	35
2. 3 Mikroskopická analýza trojrozměrných vlákenných vrstev	35
2. 3. 1 Rastrovací elektronová mikroskopie	36
2. 3. 2 Mikroskopie atomových sil	46
3. Diskuse výsledků	54
4. Závěr	56
Literatura	58

Úvod

Trojrozměrné vlákenné struktury s mikrometrovými, submikrometrovými a nanometrovými průřezy vláken jsou v současné době považovány za slibný materiál pro využití v biomedicínských aplikacích. Lze je využít jako porézní polymerní matrice, ve kterých se zachycují buňky tvořící novou tkáň. Póry takové matrice musí být nejen dostatečně velké, ale zároveň i navzájem propojené tak, aby do nich buňky mohly vstoupit, popřípadě v nich migrovat, ale zejména se dále množit. Povrchy polymerních struktur by měly navíc obsahovat takové molekulární látky, se kterými by buňky mohly interagovat.

Cílem současného tkáňového inženýrství je studium možností tvorby takových materiálových struktur, které by za vhodných podmínek nahradily poškozené tkáň a jejich funkce. Polymerní trojrozměrné vlákenné struktury slouží především jako nosiče pro pěstování buněk, které jsou následně implantovány do příslušné oblasti poškozené tkáň. Buňky mohou růst buď na povrchu vlákenného materiálu, nebo mohou být díky jeho vysoké porozitě zabudovány přímo do jeho vnitřní struktury. Vláknenný nosič může být v závislosti na chemickém složení materiálu buď plně vstřebatelný, nebo může sloužit jen pro přenos kultivovaných buněk.

Příprava vláknenných nosičů, které vykazují vhodnou povrchovou a vnitřní strukturu, je pro zabudování buněk klíčová. Technologie stejně jako volba materiálu z hlediska chemického složení je zásadní a vede k dosažení požadovaných parametrů. Připravené vzorky trojrozměrných vláknenných struktur je tedy nutné sledovat a analyzovat z hlediska výše uvedených požadavků.

Cílem bakalářské práce je studium trojrozměrných vláknenných struktur vyrobených metodou elektrostatického zvlákňování. Materiály použité pro jejich přípravu náleží do skupiny biodegradovatelných polymerů, konkrétně se jedná o dva typy – polyvinylalkohol a polykaprolakton. Tyto materiály jsou dobře zpracovatelné a z materiálového hlediska jsou potenciálně využitelné v biomedicínských aplikacích.

Analýzy budou zaměřeny jednak na studium trojrozměrných struktur z hlediska prostorového uspořádání vláken, jednak na posouzení struktury vláken, která je zásadní z hlediska předpokládaného prorůstání biologickým buněčným materiálem. Ke studiu budou využity příčné řezy a lomy struktur. Dle zadání práce se předpokládá, že analýzy budou prováděny na rastrovacím elektronovém mikroskopu, mikroskopu atomových sil a transmisním elektronovém mikroskopu.

Na základě vyhodnocených struktur budou získány informace o prostorovém uspořádání vláken, průměrech vláken a základní informace o jejich struktuře, která je pro prorůstání buněčné populace živočišných buněk - fibroblastů klíčová.

1. Teoretická část

1. 1 Základní charakteristika trojrozměrných vlákenných vrstev a jejich význam

Trojrozměrné vláknové struktury jsou svým charakteristickým uspořádáním prakticky využitelné v řadě biologických aplikací – v současné době však zejména v tkáňovém inženýrství. Požadavky kladené na tkáňové nosiče, kterými se tyto specifické trojrozměrné struktury bezpochyby mohou stát, jsou nesmírně rozsáhlé. Náleží sem otázka biodegradability použitých materiálů, jejich biokompatibilita, prostorové uspořádání vláken tvořících struktury, hustota vláken, velikost pórů mezi vlákny a průměry vláken.

Při zajištění požadavků jakými je biodegradabilita a biokompatibilita je nutné vytvořit takové prostorové útvary, které budou vyhovovat prorůstání buněk. Struktury je nutné studovat jak po stránce vnitřního uspořádání vláken a jejich dalších již zmíněných parametrů, které souvisí s technologií výroby, tak po stránce požadavků kladených pro předpokládané prorůstání buňkami. Na základě uvedených požadavků je důležité zabývat se morfologickou analýzou trojrozměrných struktur, která by měla být zpětnou kontrolou k technologii jejich výroby. K morfologické analýze jsou vhodné následující mikroskopické techniky: skenovací elektronová mikroskopie (SEM), transmisní elektronová mikroskopie TEM a mikroskopie atomárních sil (AFM).

1. 1. 1 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství je poměrně nový vědní obor zabývající se vývojem a využitím uměle vytvořených struktur buněk a jejich nosičů k obnově nebo náhradě defektní nebo poraněné části těla. Spojuje znalosti z molekulární biologie, biochemie, fyziky, farmacie a medicíny. Aplikuje zákonitosti metody inženýrství na vývoj biologických náhrad, které slouží k obnově, náhradě nebo regeneraci tkání. Vhodným užitím a seskupením buněk, využitím biochemických faktorů a přijatelným tkáňovým nosičem - „scaffoldem“ lze dosáhnout požadovaných výstupů.

Pro rozvoj moderního tkáňového inženýrství jsou nejdůležitější vláknové nosiče. Používají se v regenerativní medicíně a podporují tvorbu nové nebo obnovu poškozené tkáně v těle pacienta. Vizí či dnes dokonce alternativou je vytváření tkání či celých orgánů z buněk na vhodném nosiči. Úspěchů již bylo dosaženo při vývoji uměle vytvořené chrupavky, kostí, kůže, šlach, vazů, močové trubice a měchýře, ledviny, svalů, cév, rohovky, střeva, kloubů, slinné žlázy i nervů. [1], [2]

V práci Lékařské textilie – 1. díl je blíže rozebrána tematika tkáňového inženýrství. Popisuje celý proces přípravy umělé tkáně, který se skládá z přípravy vhodného nosiče: biopsie tkáně, izolace buněk, pěstování, množení a (proliferace) buněk; osídlování nosiče buňkami a implantace štěpu. Volba buněk vhodných pro konkrétní použití je podstatnou podmínkou pro úspěšnou léčbu. [1]

Prvotním zdrojem tkáně může být pacientova vlastní zdravá tkáň – tedy buňky autologní, jejichž aplikace není spojena s rizikem odmítnutí imunitním systémem. Pojem autologní všeobecně značí pocházející ze stejného jedince (v případě tkáňového inženýrství sem patří buňky diferencované, progenitorové a buněčné linie odvozené z buněk kmenových) - tedy shodný dárce i příjemce. V řadě případů však není možné tyto buňky separovat případně expandovat v dostatečném množství. Možným řešením v takovém případě jsou buňky pocházející od dárců stejného nebo jiného druhu, což je ale spojeno s nebezpečím jejich odmítnutí imunitním systémem příjemce [1].

Buňky pocházející z různých jedinců stejného druhu, tedy například člověk - člověk, se nazývají alogenní. Geny se liší alespoň na jednom lokusu. Lokus je pozice, kterou na chromozomu zaujímá jeden nebo více genů. Heterologní či xenogenní buňky pocházejí z jedince jiného druhu, tedy různý druh dárce, například prase – člověk [1].

K nahrazení tkáně je zapotřebí trojrozměrné struktury. Tkáňový nosič se tedy musí strukturálně přiblížit extracelulární matici, musí být porézní pro dosažení dobré buněčné adheze.

1. 1. 2 Požadavky kladené na tkáňové nosiče

Ideální tkáňový nosič musí splňovat celou řadu požadavků jak po stránce strukturní tak po stránce biologické a technické. V první řadě musí být kompatibilní pro imunitní snášenlivost pacienta, aby nedocházelo k vyvolávání imunologických reakcí. Zároveň je nutné zajistit podmínku biokompatibility. [3]

Tkáňový nosič se strukturálně musí přiblížit mezibuněčné tkáňové struktuře tak, aby mohly buňky proliferovat. Dále musí být kompletně odbourán a vstřebán, čili materiál musí být biodegradabilní. Pro zajištění proliferace buněk je u tkáňového nosiče bezpodmínečně nutné dosáhnout správné velikosti pórů. Všechny póry musí být vzájemně propojené a jejich velikost musí být současně dostatečná vzhledem k velikosti buněk. Dále je třeba zajistit optimální mechanické vlastnosti nosiče stejně jako jeho specifický povrch, který je důležitý z hlediska zajištění povrchové adheze buněk. [3]

K výše uvedeným požadavkům je potenciálně velmi zajímavé využití trojrozměrných specifických vláknenných materiálů, ve kterých se průměry vláken blíží mikrometrovým, submikrometrovým až nanometrovým rozměrům. Pro růst buněk je nutné vytvořit silnou trojrozměrnou polymerní vrstvu z takového materiálu, který bude jak biodegradabilní tak biokompatibilní. V tomto ideálním prostředí bude pro buňky zajištěn dostatek kyslíku a růstových faktorů a tak bude umožněna proliferace buněk v tomto prostředí. Kultivace buněk na scaffoldu probíhá in vitro za přítomnosti živin a růstových faktorů. Následné proniknutí buněk do nosiče probíhá in vivo, tedy nahrazení tkáně v přirozeném prostředí. [1], [2]

1. 1. 3 Biokompatibilita a biodegradabilita

Biokompatibilita se posuzuje podle interakce s prostředím, zejména podle cytotoxického a toxikologického působení a dále podle alergických, teratogenních či mutagenních reakcí. Pozornost se soustředí na infekční procesy, podle rozsahu a kvality

biodegradace. Velmi důležité je, aby materiál neovlivňoval koagulaci (srážlivost krve) a nevyvolával zánětlivou reakci. Při hodnocení biokompatibility je velmi důležitý *faktor času*, rozlišuje se biokompatibilita dlouhodobých a krátkodobých implantátů a biokompatibilita produktů tkáňového inženýrství [3], [4].

Biokompatibilita dlouhodobých implantátů vyjadřuje schopnost implantátu začlenit se v prostředí hostitele, aniž by docházelo k vyvolání nežádoucích lokálních nebo systémových efektů [4].

Biokompatibilita implantátů pro krátkou aplikaci se týká medicínských zařízení umístěných záměrně mimo kardiovaskulární systém za účelem přechodné diagnostiky nebo s terapeutickým záměrem. Vyjadřuje schopnost implantátu vykonávat zamýšlenou funkci bez krevního proudění, přičemž interakce s krví je jen minimální. Zároveň nebude docházet k nekontrolované aktivaci buněčných nebo plazmových proteinových kaskád [4].

Biokompatibilita produktů tkáňového inženýrství (scaffold nebo matrix) se týká jejich schopnosti podporovat příslušnou buněčnou aktivitu, která zahrnuje podporu molekulárním a signálním systémům za účelem optimalizovat regeneraci tkáně. Nesmí při tom docházet k nežádoucím efektům v buňkách, rovněž nesmí být vyvolávána nežádoucí lokální nebo systémová odezva v případném hostiteli [4].

Biokompatibilita umělých materiálů a lidského těla je velmi složitý proces, který zahrnuje disciplíny náležející tradičně k lékařské vědě, nauce o povrchích, k materiálovým vědám a molekulární biotechnologii. Pokud je materiál umístěn do organismu, okamžitě je atakován jeho povrch. Během několika milisekund po umístění implantátu do organismu se na jeho povrchu utváří biovrstva obsahující vodu, protein a další biomolekuly z fyziologických tekutin. Buňky z okolních tkání následně migrují do prostoru kolem implantátu, aby stimulovaly cytokinezi a dalšími růstovými faktory vznikající biovrstvu. Interakce mezi povrchem implantátu a buňkami je zprostředkována právě touto biovrstvou. [4]

Biodegradabilita je schopnost odbourávat organické látky živými organismy. Organické materiály mohou degradovat aerobně – při působení kyslíku, nebo anaerobně – bez působení kyslíku.

Biodegradabilními materiály jsou zpravidla organické materiály (například rostlinné a živočišné hmoty získané původně z živých organismů) nebo i umělé materiály podobné přírodním (aby mohly být využity mikroorganismy). V tkáňovém inženýrství se často využívají polymerní materiály. Biodegradabilní polymery mohou být přírodní a syntetické. Mezi přírodní patří například želatina, elastin, chitosan a kolagen. Mezi nejčastěji používané syntetické polymery patří kyselina polylaktidová (PLA), kyselina polyglykolová (PGA), polyvinylalkohol (PVA), polyvinylpyrolidon (PVP) a polykaprolakton (PCL). [4]

V této bakalářské práci jsou hodnoceny dva materiály - *polykaprolakton (PCL)* a *polyvinylalkohol (PVA)*, z nichž byly připraveny trojrozměrné vlákenné vrstvy, které byly následně studovány z hlediska jejich morfologie.

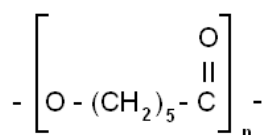
1. 2 Výroba trojrozměrných vlákenných vrstev

K výrobě trojrozměrné vlákenné až nanovlákenné struktury je standardně využívána modifikovaná technologie elektrostatického zvlákňování. Z materiálového hlediska jsou obvykle voleny biokompatibilní a biodegradabilní polymery.

1. 2. 1 Materiály používané při výrobě trojrozměrných vlákenných vrstev

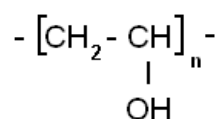
Pro výrobu vlákenných vrstev jsou běžně využívány biodegradovatelné polymery jako například polyvinylalkohol, polykaprolakton a chitosan, popřípadě jejich kombinace. Pro přípravu silné trojrozměrné nanovlákenné struktury byl zvolen biokompatibilní a biodegradabilní PCL (polykaprolakton) a PVA (polyvinylalkohol), jejichž základní parametry jsou dále uvedeny.

Polykaprolakton (PCL) – viz obr. 1 - patří mezi alifatické polyestery, které jsou obecně náchylné k hydrolýze a jsou biodegradovatelné. Polykaprolakton se připravuje polymerizací ϵ -kaprolaktonu za přítomnosti katalyzátorů. Výsledný polymer je semikrystalický materiál s teplotou skelného přechodu kolem -60°C a teplotou tání kolem 60°C . Tento polymer má rozsáhlé uplatnění v lékařství jako nosný materiál při tvorbě systémů pro dlouhodobé uvolňování léčivých látek a jako nosná konstrukce pro tvorbu buněčných scaffoldů. Polykaprolakton je degradován hydrolýzou svých esterových vazeb ve fyziologických podmínkách, podobně jako je tomu v lidském těle. Tím získal velkou pozornost pro použití v oblasti biomateriálů, byl schválen také pro potraviny a léčiva. Ve stomatologii je používán jako kompozitní materiál při plnění kořenového kanálku. [3], [6], [7]



Obr. 1 Schematické znázornění konstituční jednotky makromolekulárního řetězce PCL [6]

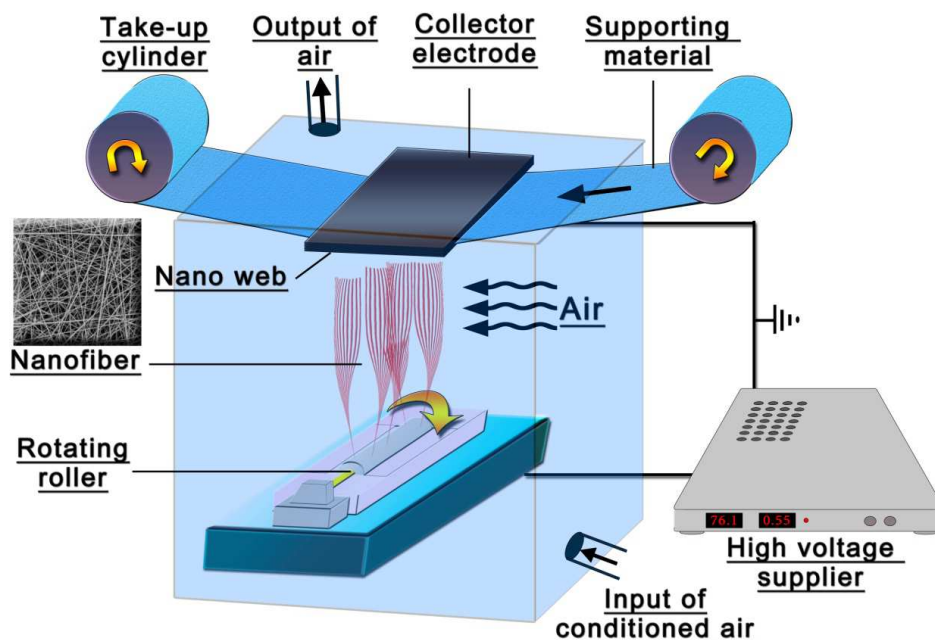
Polyvinylalkohol (PVA) – viz obr. 2 - je připravován polymerizací vinylacetátu na polyvinylacetát a následně hydrolyzován na polyvinylalkohol. Stupeň polymerizace určuje molekulární hmotnost a stupeň hydrolýzy přeměny polyvinylacetátu na polyvinylalkohol. Teplota skelného přechodu pro částečně hydrolyzovaný PVA je přibližně 60°C a pro plně hydrolyzovaný PVA cca 85°C . Teplota tání částečně hydrolyzovaného PVA leží v rozmezí 180°C až 190°C a se zvyšujícím se stupněm hydrolýzy teplota roste až k 230°C . V amorfním stavu je PVA rozpustný ve vodě, v kyselinách a ve fenolu. V organických rozpouštědlech je nerozpustný. PVA se používá k mnoha účelům: při výrobě papíru, lepidel, barev, farmaceutických výrobků, keramiky, jako šlichty pro polyamidy a umělé hedvábí. Dále jako součást tiskových barev, zubních past či jako šicího chirurgického materiálu. Díky své biodegradabilitě se používá jako polymer pro výrobu zdravotnických textilií. [3], [8]



Obr. 2 Schematické znázornění konstituční jednotky makromolekulárního řetězce PVA [8]

1. 2. 2 Technologie využívané pro výrobu trojrozměrných vlákenných vrstev

Příprava trojrozměrných vlákenných vrstev využívá vodivosti polymerních roztoků a tavenin určených ke zvlákňování a jejich formování působením elektrostatického pole. Vzniklá vlákna mikrometrových, submikrometrových a nanometrových rozměrů jsou za působení elektrostatického pole deponována na podložku. Nejčastěji je tato podložka z textilního materiálu, který se pohybuje po povrchu zemněné elektrody – viz obr. 3. Zvlákňování probíhá mezi dvěma elektrodami. První z nich má podobu kapiláry, na kterou je přivedeno vysoké napětí. Vnitřkem kapiláry je vytlačován roztok polymeru, který je v přímém kontaktu s elektrodou. Na špičce kapiláry vzniká tzv. Taylorův kužel. Aby byl udržen jeho kuželovitý tvar, musí rychlost s jakou je kapalina od kapiláry odtažována odpovídat rychlosti, s jakou je kapalina vháněna do kapiláry. Proud polymeru od napájecí k zemní elektrodě však může pokračovat i tehdy, dojde-li ke zhroucení kužele. Cestou k uzemněné elektrodě se odpařuje rozpouštědlo a tvoří se nabitá vlákna výše zmíněných rozměrů, které se usazuje na povrchu materiálu umístěného před zemněnou elektrodou. [9]



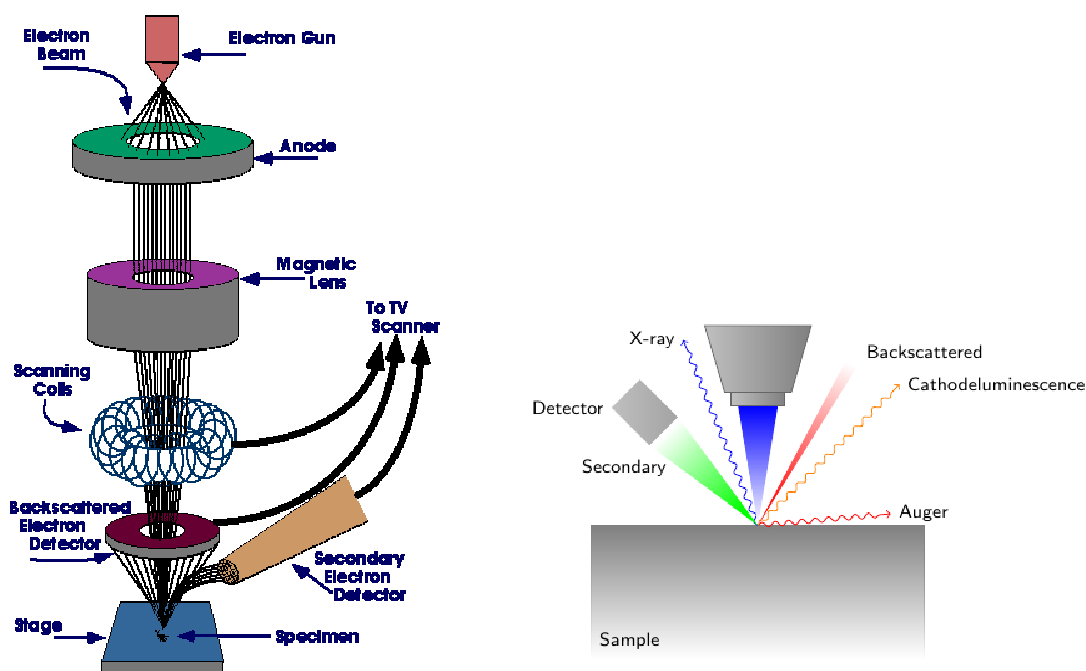
Obr. 3 Schematické znázornění obecného procesu elektrostatického zvlákňování [10]

1. 3 Analýza trojrozměrných vláknenných vrstev

Trojrozměrný vláknenný nosič se musí strukturně přiblížit buněčné tkáni a pro dostatečnou adhezi buněk musí vykazovat vhodnou porézní strukturu. Aby mohly buňky osídlit tuto syntetickou tkáň, je nutné dosáhnout také správné velikosti pórů. Tyto parametry – rozložení vláken, rozměry vláken a hustota rozložení vláken – je zapotřebí zhodnotit k posouzení vhodnosti výběru použitého materiálu stejně jako technologických parametrů. Pro zjištění výše uvedených parametrů sledovaných struktur jsou vhodné následující mikroskopické techniky: rastrovací (skenovací) elektronová mikroskopie, mikroskopie atomových sil a transmisní elektronová mikroskopie.

1. 3. 1 Mikroskopická hodnocení

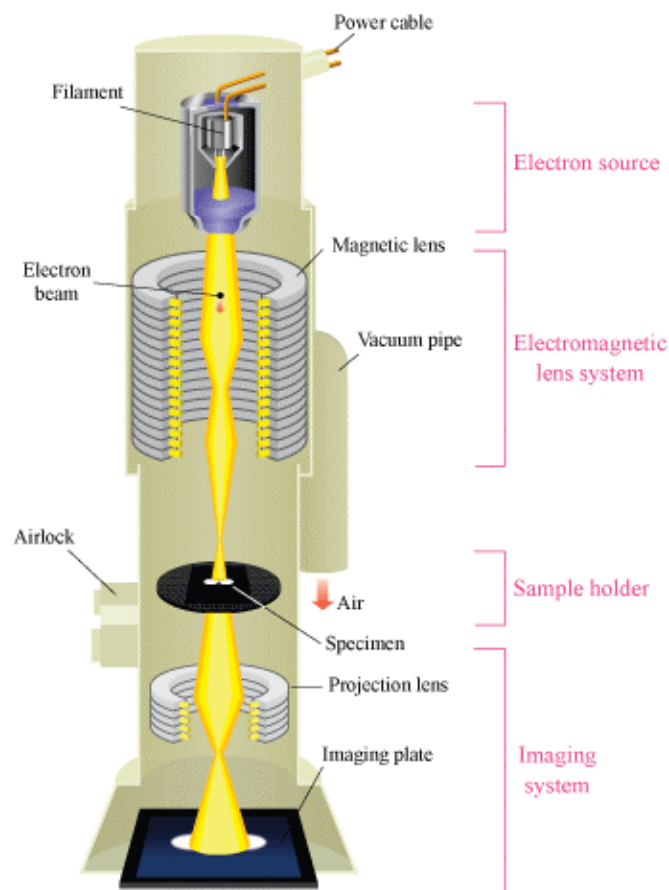
Rastrovací (skenovací) elektronový mikroskop (REM, SEM) je obecně určen zejména k pozorování povrchu vzorků. Svazek primárních elektronů prochází optickou soustavou a cívkami řádkovacího systému je vychylován tak, že řádek po řádku přejíždí vymezenou plochu povrchu vzorku. V každém bodě povrchu dochází k fyzikálním jevům, z nichž se pro tento typ mikroskopie využívá emise sekundárních elektronů (z hloubky maximálně 10 nm) a odražených primárních elektronů. V blízkosti vzorku je umístěn detektor sekundárních elektronů, z něhož se zachycený signál přenáší na monitor. Kontrast obrazu se vytváří převážně na základě rozdílné orientace jednotlivých nerovností sledovaného povrchu vůči svazku primárních elektronů – viz obr. 4. Výhodou skenovacího mikroskopu je možnost sledování vzorků při malém i velkém zvětšení a velká hloubka ostrosti. Nevodivé vzorky musí být speciálně upraveny – na povrch se napaří tenká vrstva vodivého materiálu (uhlík, zlato, zlato – paladium) pak nedochází k jejich nabíjení statickou elektřinou. [11], [12].



Obr. 4 Zjednodušené znázornění principu rastrovací elektronové mikroskopie [13], [14]

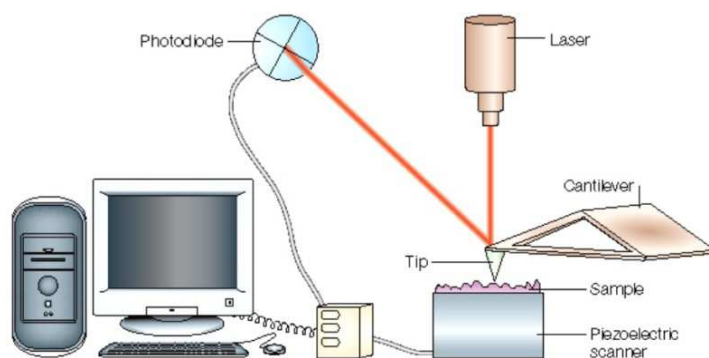
Transmisní elektronový mikroskop (TEM) - viz obr. 5 - umožňuje pozorovat tenké preparáty s velkou rozlišovací schopností. Funguje podobně jako světelný mikroskop, jen využívá průchodu elektronů, nikoliv viditelného světla. TEM potřebuje ke své činnosti další systémy, které u světelného mikroskopu nejsou. Například vysokonapěťový zdroj, elektroniku k řízení mikroskopu a vakuový systém pro vyčerpání vnitřního prostoru mikroskopu na hodnotu, která zabezpečí střední volnou dráhu elektronu v délce 3 nm. [15]

Vzorky pro TEM nesmí obsahovat vodu, tloušťka vzorku nemá přesáhnout 100 nm. Silnějšími preparáty elektrony neprojdou. Obraz je zatížený chromatickou vadou a nezaostří se. Metody pro přípravu vzorků pro TEM jsou různé, patří sem chemické postupy, fyzikální postupy (např. působení teploty a záření) či příprava ultratenkých řezů. [16]



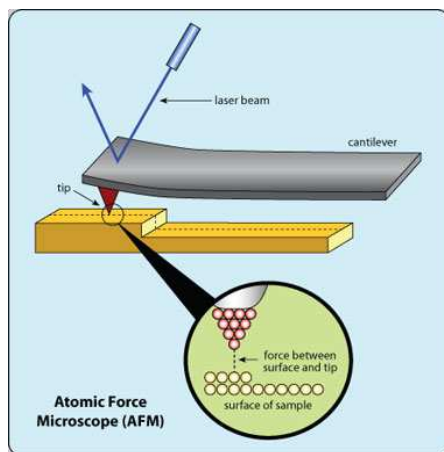
Obr. 5 Zjednodušené znázornění principu transmisní elektronové mikroskopie [17]

Mikroskopie atomárních sil je mikroskopická technika, která se používá k trojrozměrnému zobrazování povrchů – viz obr. 6, 7. Obraz povrchu vzorku – model povrchu se vytváří bod po bodu. Metoda dosahuje velmi vysokého rozlišení. Technika AFM se používá nejen k zobrazování, ale též k tvorbě struktur či zpracování povrchů v nanometrové oblasti. K detekci slouží vzájemná meziatomová přitažlivost. Detekuje se pohyb rastrující sondy při průchodu nad vzorkem. AFM umožňuje zobrazovat i nevodivé vzorky. Základem AFM je velmi ostrý hrot, který je upevněn na ohebném nosníku (cantilever). Hrot je mírně vtlačován do vzorku - během měření se hrot pohybuje po povrchu vzorku v pravidelném rastru tak, že výška druhého konce nosníku je konstantní. Je-li povrch vzorku nerovný, má nosník v různých místech vzorku různou velikost průhybu a sledováním závislosti průhybu na poloze na vzorku (pomocí laseru) lze sestavit zvětšený obraz vzorku. [18]



Schematic representation of the components of an atomic force microscope (AFM).

Obr. 6 Zjednodušené znázornění principu mikroskopie atomárních sil - 1 [19]



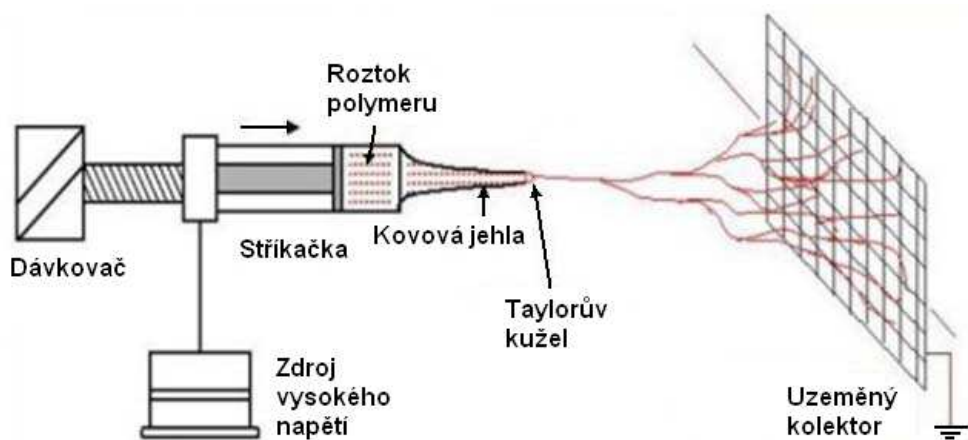
Obr. 7 Zjednodušené znázornění principu mikroskopie atomárních sil - 2 [20]

Vláknenné struktury lze však zkoumat i dalšími technikami. Mezi často používanou techniku patří tzv. *stereologické řezy*, které se zabývají geometrickou analýzou. Cílem je hledání spojitosti mezi materiálem, technologií jeho přípravy a výslednými vlastnostmi. Řez vzorkem je definován jako dvourozměrný rovinný řez trojrozměrného tělesa. Díky této technice je možné proniknout do nitra trojrozměrného materiálu a zjistit strukturu, která je jak okem, tak dalšími běžnými analýzami nepostřehnutelná. [21]

2. Experimentální část

2.1 Laboratorní příprava trojrozměrných vláknenných vrstev

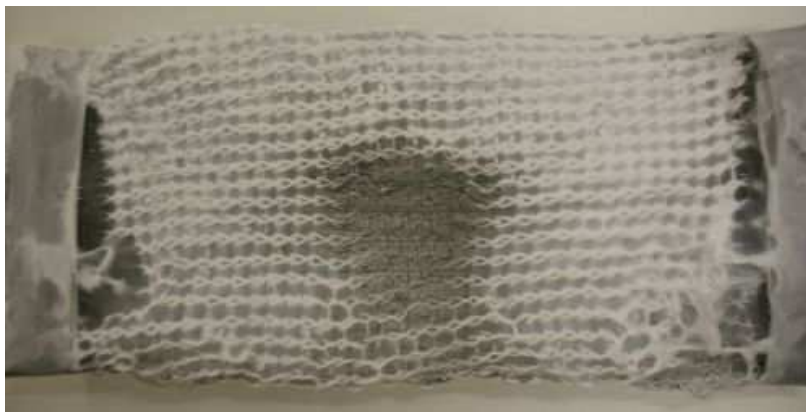
Vláknenná trojrozměrná struktura obou studovaných materiálů – polykaprolaktonu a polyvinylalkoholu byla vyrobena na Technické univerzitě v Liberci, Fakultě textilní - Katedře netkaných textilií Ing. Jiřím Chvojkou metodou elektrostatického zvlákňování s využitím nově vyrobeného strukturovaného kolektoru – viz obr. 9, 10, 11. Na obr. 8 je znázorněna analogická sestava, která je využívána v laboratoři TUL na Katedře netkaných textilií a nanovláknenných útvarů. Injekční stříkačka obsahující polymerní roztok je umístěna na dávkovací pumpě. Pumpa dodává konstantní množství polymeru, který je vytlačován z jehly. Na kapce vytvořené na špičce jehly se v elektrostatickém poli začíná tvořit jeden nebo více Taylorových kuželů. V určité vzdálenosti od jehly můžeme pohyb polymeru charakterizovat jako pohyb stabilní. Vlákně je dlouženo ve směru jehly. Po této „klidové zóně“ se vlákno dostává do zóny nestabilní. Dochází k dloužení vlákna a jeho následnému usazení na kolektoru. [22]



Obr. 8 Schematické znázornění laboratorně používaného zvlákňovacího zařízení [23]

Materiály použité pro výrobu trojrozměrných vláknenných struktur:

- 1) 18% roztok PCL od firmy ALDRICH ve směsi chloroform - etanol v poměru 9:1, molekulová hmotnost 45 000 [g/mol]
- 2) 12% vodný roztok PVA od firmy NOVAKY, Slovenská republika, molekulová hmotnosti 60 000[g/mol], demineralizovaná voda.



Obr. 9 Snímek speciálního 3D strukturovaného kolektoru pokrytého materiálem PCL



Obr. 10 Snímek speciálního 3D strukturovaného kolektoru pokrytého materiálem PCL



Obr. 11 Snímek speciálního 3D strukturovaného kolektoru pokrytého materiálem PCL

2. 2 Příprava vzorků pro následná analytická hodnocení

Pro hodnocení rozložení vláken, rozměrů vláken, hustoty rozložení vláken – parametrů důležitých pro následné osídlení vlákenných struktur buňkami – je zapotřebí připravit kvalitní vzorky pro mikroskopická pozorování. Zhodnocení struktury současně slouží k posouzení vhodnosti materiálu použitého k přípravě vzorků trojrozměrných vláknových struktur stejně jako technologických parametrů výroby.

Vzorky byly připravovány *několika způsoby*. Jedna skupina vzorků byla *příčně řezána* (se zalitím v polymerní hmotě nebo přímo), druhá skupina vzorků byla *podchlazena v kapalném dusíku a následně zlomena* a další pokusy byly provedeny na vzorcích řezaných *mikrotomem a laserem*.

2. 2. 1 Příprava vzorků pro příčné řezy

Příprava vzorků pro příčné řezy spočívala v zalití trojrozměrné vlákenné vrstvy PCL a PVA do technického Dentacrylu. Technický Dentacryl je průhledná dvousložková metylmetakrylátová licí pryskyřice, která je standardně dodávána ve formě práškového polymeru a kapaliny – polymeru a iniciátoru polymerace – viz obr. 12. Výrobce je SpofaDental, a.s. Dentacryl samovolně polymerizuje po smísení obou složek. Po jeho vytvrzení vznikne bezbarvá hmota, kterou je možné snadno řezat, brousit a leštit. Umožňuje široké spektrum použití v různých průmyslových a technických oborech (elektrotechnice, strojírenství, metalurgických laboratořích). Pro své vhodné vlastnosti, zejména tekutost, byla tato pryskyřice vybrána jako první materiál, do kterého byla trojrozměrná vlákenná vrstva zalita. [24]



Obr. 12 Dentacryl - dvousložková metylmetakrylátová licí pryskyřice [24]

Do vhodné nádoby – byla použita Petriho miska – byly odměřeny 2g kapalné složky, do které bylo za stálého míchání přidáno příslušné množství práškového polymeru. Prášek byl v kapalině rozpuštěn a během krátké doby započal proces polymerace, jehož výsledkem byl v první fázi vznik viskózní kapaliny, v druhé vznik tuhého polymeru.

Vzorek o rozměrech cca 20×15 mm, který byl odstřižen ze vzorku základního materiálu, byl s pomocí pinzety smočen v polymerující pryskyřici – viz obr. 13 - 15. Tento impregnovaný vzorek byl stočen a položen na stejně velký vzorek z netkané textilie – spun-bondu (fa Pegas Nonwovens Znojmo) a spolu s ním zarolován. Aby stočené vrstvy polykaprolaktonu a spun-bondu držely pevně u sebe, byly k sobě připevněny svorkami – viz obr. 16 a nechaly se 20 min vytvrdnout za normální teploty.



Obr. 13 Snímky smáčení PCL v Dentacrylu



Obr. 14 Snímek vzorku polykaprolaktonu (vpravo) a netkané textilie – spun-bondu (vlevo)



Obr. 15 Impregnovaný vzorek polykaprolaktonu na spun-bondu

Tímto způsobem bylo pro následné mikroskopické hodnocení připraveno 10 vzorků polykaprolaktonu (PCL) a polyvinylalkoholu (PVA). Připravené vzorky byly položeny na tvrdý podklad a kolmo k podélnému směru vláken byly provedeny řezy žiletkou.



Obr. 16 Stočený impregnovaný vzorek polykaprolaktonu připravený k řezu

Tento postup přípravy vzorků vlákenných vrstev pro příčné řezy a jejich následné mikroskopické hodnocení byl u obou materiálů, polykaprolaktonu i polyvinylalkoholu, neúspěšný.

U trojrozměrné vlákenné vrstvy z polykaprolaktonu nedošlo k prosycení připravené vlákenné struktury pryskyřicí. Nedostatečné prosycení lze vysvětlit přítomností pórů v trojrozměrné struktuře ale i možnou nízkou smáčivostí vzorku pryskyřicí při probíhajícím procesu vytvrzování. Následný příčný řez žiletkou studovanou vlákennou strukturu pouze zdeformoval – nedošlo k vytvoření požadovaného řezu, který by mohl být následně hodnocen z hlediska rozložení vláken, rozměrů vláken, hustoty rozložení vláken a dutin (pórů) ve struktuře.

V případě vzorku trojrozměrné struktury z polyvinylalkoholu (PVA) došlo k jeho rozpuštění v pryskyřici. Na skenovacím elektronovém mikroskopu (SEM) nebyly po provedení kolmého řezu žiletkou zřejmé a viditelné žádné vlákenné struktury na bázi PVA. Na základě tohoto neúspěšného postupu, kterým měl být připraven příčný řez vlákennou strukturu, byl zvolen další druh zalévací pryskyřice pro přípravu vzorků.

Dalším typem pryskyřice k impregnaci trojrozměrné vlákenné struktury byla Epon-Durcupanová pryskyřice zakoupená od firmy SIGMA ALDRICH, náležící mezi epoxidové pryskyřice, které polymerují bez významějšího smrštění a nevykazují nestejnou polymeraci. Metoda zalévání do Epon-Durcupanové pryskyřice – viz tab.1 – se používá na přípravu ultratenkých řezů pro zobrazování buněk a tkání na elektronovém mikroskopu. Z tohoto důvodu byla metoda zalévání vyzkoušena k vytvoření vzorků pro příčné řezy trojrozměrné vlákenné struktury. Na skenovacím elektronovém mikroskopu měla být znázorněna pórovitost mezi vlákny a jejich vnitřní struktura. [25]

Tab. 1 Složení Epon –Durcupanové pryskyřice

Složení Epon-Durcupanové pryskyřice				
	Durcupan AM red	Durcupan AM blue	Epon 812	Durcupan AM yellow
Dílů ve směsi	1	3	1,25	0,1
% ve směsi	18,7	56,1	23,4	1,8

Z trojrozměrné vlákenné vrstvy z polykaprolaktonu (PCL) a polyvinylalkoholu (PVA) byl odebrán vzorek požadovaných rozměrů 5×5 mm. Každý z těchto materiálů byl vložen do připravené formy s výše popsanou pryskyřicí – obr. 18. Po vytvrzení byly provedeny příčné řezy těchto vzorků na mikrotomu – obr. 17.



Obr. 17 Příklad přístroje na ultratenké řezy – mikrotom



Obr. 18 Vzorek trojrozměrné vlákenné vrstvy zalitý v Epon-Durcupanu
polykaprolakton (vlevo), polyvinylalkohol (vpravo)

Zalití vzorků trojrozměrných vlákenných struktur do Epon Durcupanu bylo také neúspěšné, neboť se oba materiály v pryskyřici rozpustily a na skenovacím elektronovém mikroskopu nebyla patrná žádná vlákenná struktura.

Na základě neúspěšně provedených experimentů byla navržena metoda samostatných příčných řezů trojrozměrných vlákenných vrstev. Připravené trojrozměrné vlákenné vrstvy z obou materiálů byly upraveny nůžkami do požadovaných rozměrů – obdélníků 20×15 mm. Vzorky jednotlivých materiálů byly samostatně stočeny a připevněny svorkami – obr. 19, 20. Byly položeny na tvrdý podkladový materiál a žiletkou řezány kolmo k vláknům.



Obr. 19 Vzorek trojrozměrné vlákenné vrstvy polykaprolaktonu



Obr. 20 Vzorek trojrozměrné vlákenné vrstvy polyvinylalkoholu

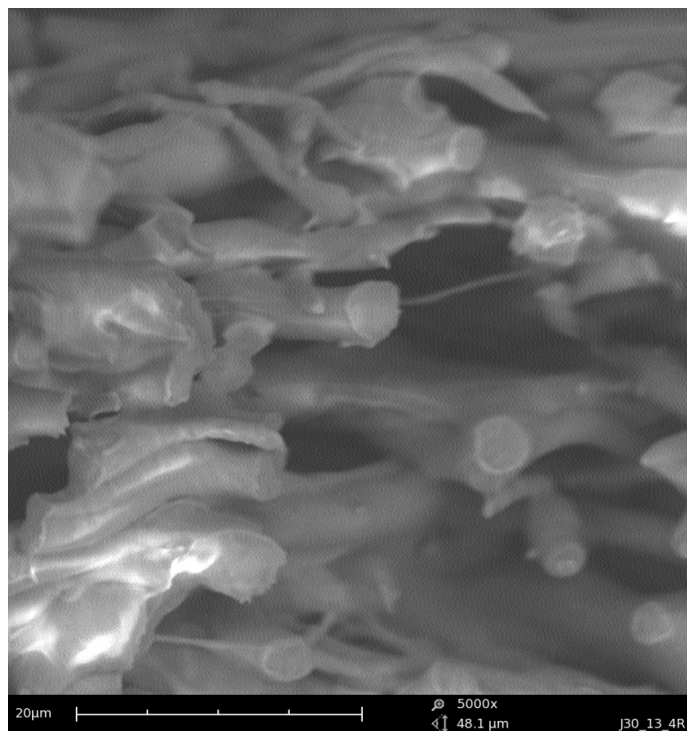
Samostatné řezy trojrozměrných vlákenných vrstev obou materiálů se také ukázaly jako neúspěšné. Při řezání žiletkou docházelo pouze k deformaci vlákenné struktury, nebylo však dosaženo požadovaného efektu – možnosti sledování rozložení vláken, rozměrů vláken, hustoty rozložení vláken a dutin (pórů) ve struktuře. Pod skenovacím elektronovým mikroskopem byla vidět pouze zdeformovaná vlákenná struktura.

2. 2. 2 Příprava vzorků pro lomy v kapalném dusíku

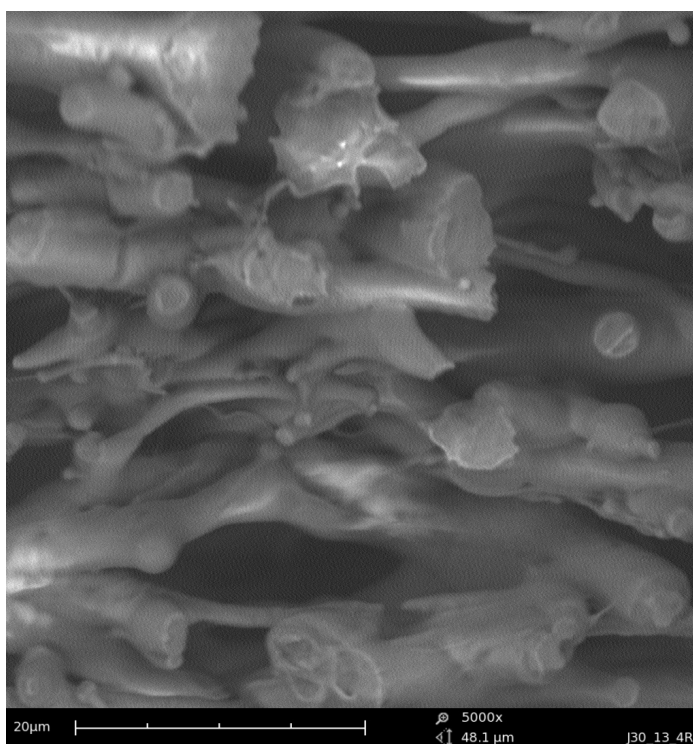
Na základě neúspěšných pokusů byla metoda příčných řezů opuštěna a byly navrženy další experimenty. Jako perspektivní se jevila metoda lámání vzorků v kapalném dusíku LN_2 . Vzorky trojrozměrných vlákenných struktur obou materiálů o rozměrech $5 \times 5 \text{ mm}$ byly v pinzetách umístěny do speciální nádoby s kapalným dusíkem, ochlazeny po dobu 1 minuty a zlomeny. K lomu vzorků došlo pouze v případě polykaprolaktonu. V případě polyvinylalkoholu k lomu vzorků nedošlo (následně pozorované vzorky byly nakonec získány jeho rychlým přetržením). Lomy vzorků PCL povrchově upravené napařením zlata byly vyhodnoceny na rastrovacím elektronovém mikroskopu FEI PHENOM – obr. 21, 22, 23.



Obr. 21 Vzorek trojrozměrné vlákenné vrstvy polykaprolaktonu
– vzorek z kapalného dusíku - 1



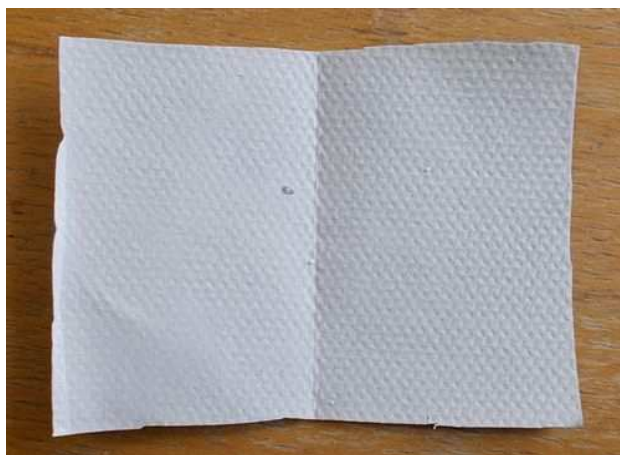
Obr. 22 Vzorek trojrozměrné vlákenné vrstvy polykaprolaktonu
– vzorek z kapalného dusíku - 2



Obr. 23 Vzorek trojrozměrné vlákenné vrstvy polykaprolaktonu
– vzorek z kapalného dusíku - 3

2.2.3 Příprava vzorků pro řezy laserem

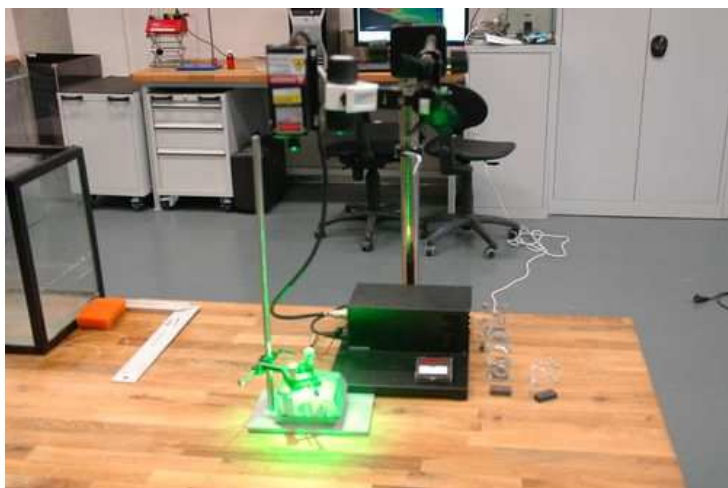
Dalším způsobem přípravy vzorků byla technika řezání trojrozměrné vlákenné struktury kontinuálním laserem – obr. 26, 27, 28, 29. Vzorky z polykaprolaktonu a polyvinylalkoholu – obr. 24, 25, byly připraveny do požadovaných rozměrů obdélníku 50 mm × 60 mm a vloženy pod laserový paprsek (výkon laseru 1W, vlnová délka 532 nm, průměr paprsku 2 mm, fokusace paprsku konkávní čočkou do průměru svazku 1 mm). U vzorku PVA působil laserový paprsek cca 10 s, u PCL cca 2s.



Obr. 24 Snímek připraveného vzorku vlákenné vrstvy z PCL



Obr. 25 Snímek připraveného vzorku vlákenné vrstvy z PVA



Obr. 26 Ukázka práce laseru - 1



Obr. 27 Ukázka práce laseru - 2

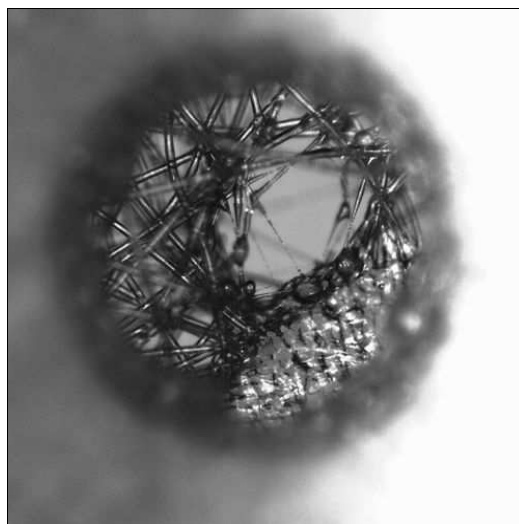


Obr. 28 Ukázka práce laseru – pohled na vzorek

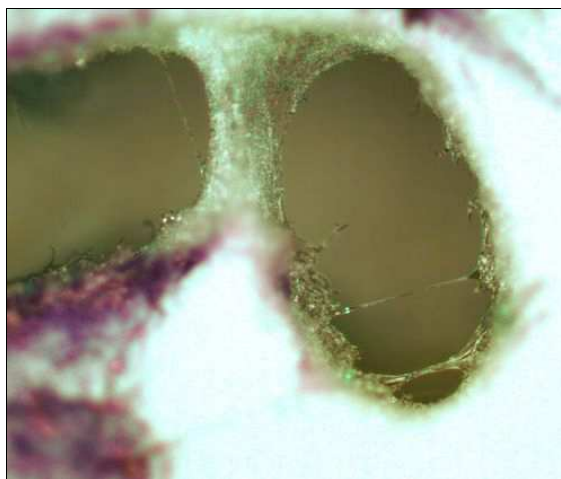


Obr. 29 Snímek laseru s čočkami

U vlákenných struktur z obou typů materiálů - PVA i PCL došlo působením paprsku k roztavení jednotlivých vláken a vzorky se seškvařily – obr. 30, 31. Tento pokus zhotovení řezů laserem se opět ukázal jako nevhodný, jelikož materiály z PCL a PVA mají poměrně nízký stupeň teploty tání. Laser byl příliš výkonný na to, aby tyto vlákenné materiály zůstaly neporušené.



Obr. 30 Snímek z optického mikroskopu NIKON ECLIPSE 80i - řez laserem polykaprolaktonu, zvětšeno 50x.



Obr. 31 Snímek z optického mikroskopu NIKON ECLIPSE LV 100 - řez laserem polyvinylalkoholu, zvětšeno 100x

2. 2. 4 Příprava vzorků pro mikroskopická hodnocení

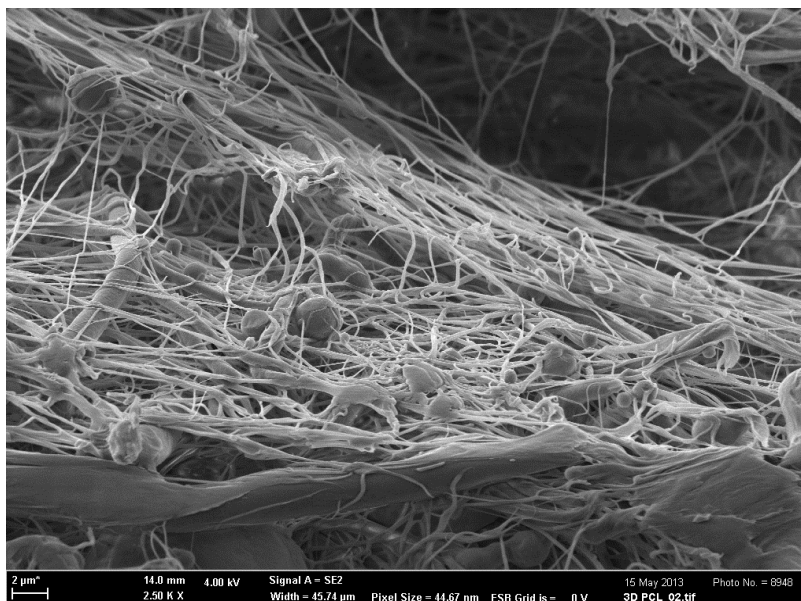
Pro každý typ mikroskopické techniky je vhodný jiný způsob přípravy vzorků. V případě rastrovací elektronové mikroskopie je používána technika napařování tenké vrstvy, kterou je zajištěna vodivost vzorků a je dosaženo zvýšení kontrastu obrazu. V případě mikroskopie atomárních sil není zapotřebí žádných příprav vzorků před vlastním pozorováním kromě jeho vhodného upevnění k podkladu. V případě transmisní elektronové mikroskopie je nutné připravit tenké řezy materiálů do tloušťky 100 nm. Vzhledem k tomu, že nebylo během předchozí přípravy vzorků materiálů dosaženo požadovaných rozměrů, nebyla transmisní elektronová mikroskopie využita k jejich studiu.

2. 3 Mikroskopická analýza trojrozměrných vlákenných vrstev

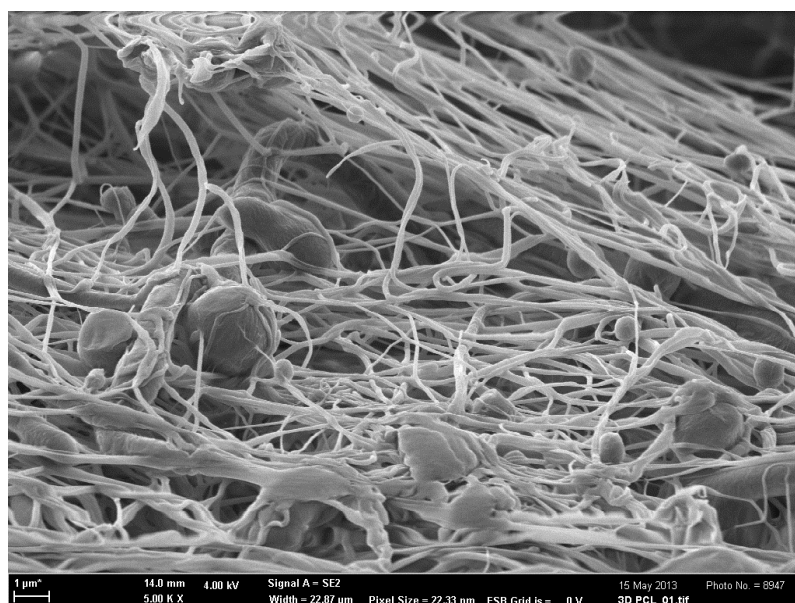
Trojrozměrné vlákenné vrstvy – průměry vláken, rozložení vláken a velikost pórů ve struktuře byly hodnoceny s využitím rastrovací elektronové mikroskopie (SEM ZEISS UltraPlus se softwarem SmartSEM) a mikroskopie atomových sil (AFM JPK Nano Wizard III). Trojrozměrné vlákenné vrstvy byly připraveny lámáním v kapalném dusíku.

2. 3. 1 Rastrovací elektronová mikroskopie

Rastrovací elektronový mikroskop byl využit k zobrazení trojrozměrných vláknenných struktur. Vzorky byly před vlastním pozorováním pokoveny vrstvou zlata o tloušťce několika nanometrů. Pro porovnání byly pořízeny i snímky dvojrozměrných vrstev.



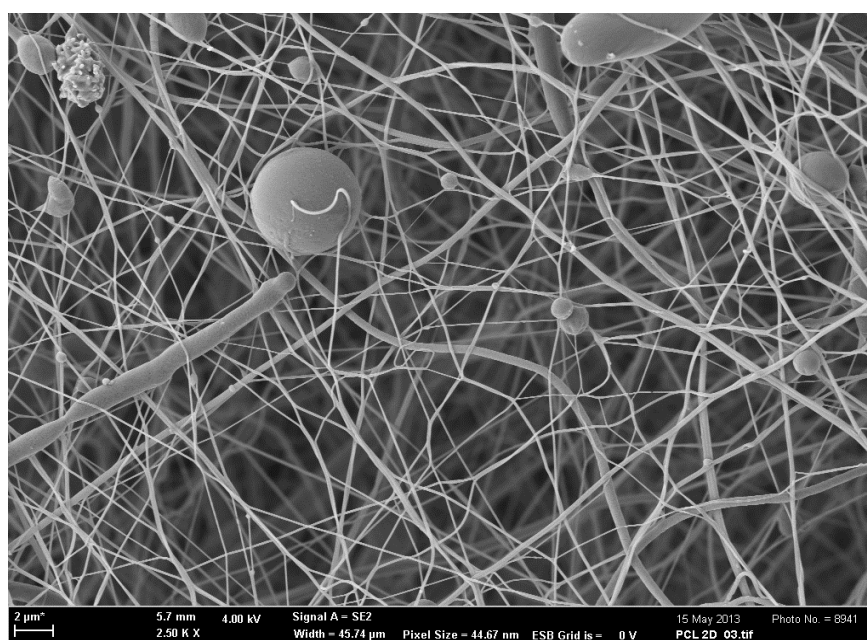
Obr. 32 Polykaprolakton – trojrozměrná vláknenná vrstva – vzorek A, ZEISS UltraPlus



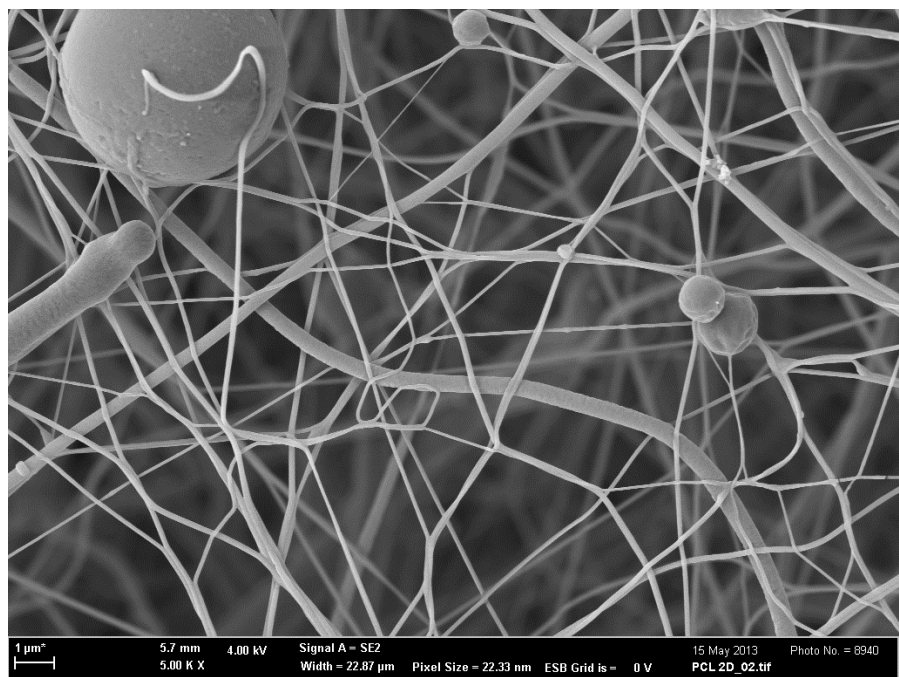
Obr. 33 Polykaprolakton – trojrozměrná vláknenná vrstva – vzorek A, ZEISS UltraPlus

Vzorek A představuje vzorek trojrozměrné vlákenné vrstvy polykaprolaktonu – obr. 32, 33. Ze snímků je zřejmé, že vrstva představuje soubor vláken mikrometrových, submikrometrových a nanometrových rozměrů. Mimo vlákna jsou ve struktuře patrné mikrometrové útvary nepravidelných tvarů. Část vláken jeví jistou uspořádanost, která může být způsobena jak primárním způsobem výroby vlákenné struktury – viz obr. 32 a obr. 33, tak sekundárně – přípravou vzorků pro mikroskopické pozorování – lomy vlákenné struktury. Dále je ze snímků vidět, že jisté procento vláken je uspořádáno nahodile, což pravděpodobně souvisí se způsobem výroby – elektrostatickým zvlákňováním polymeru. Vzájemným nahodilým uspořádáváním vláken je tak vytvářena prostorová struktura. Volné prostory mezi vlákny, v literatuře označované jako póry, se značně liší – jsou v rozmezích od desítek mikrometrů do jednotek mikrometrů.

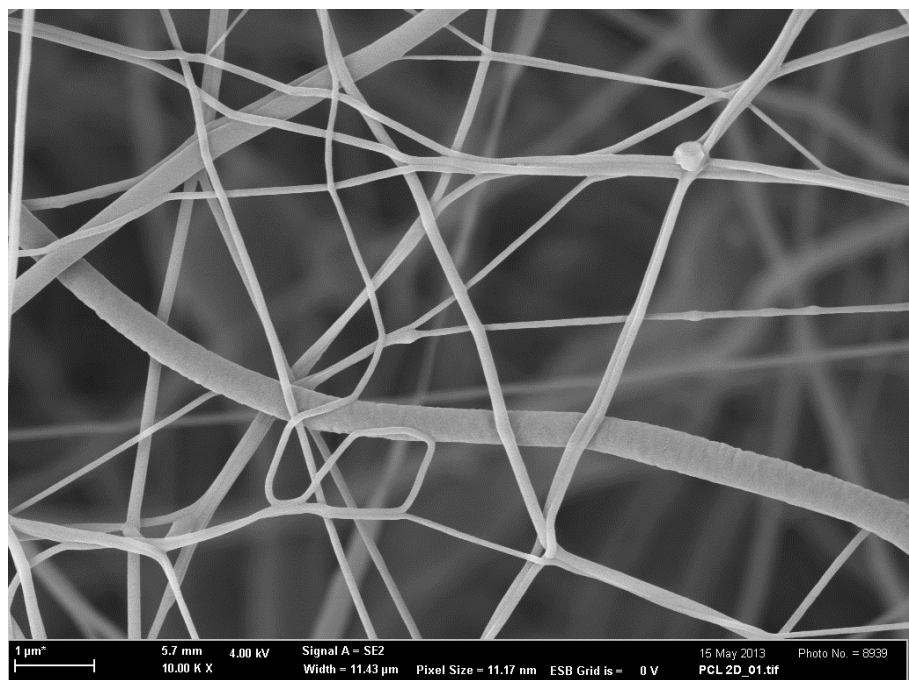
Pro doplňující informaci ke studiu trojrozměrné struktury byly pořízeny také snímky dvojrozměrné struktury – vzorky B – obr. 34, 35, 36. I v této struktuře se nacházejí vlákna mikrometrových až nanometrových rozměrů, která jsou náhodně propletena tak, že vytváří porézní strukturu. Velikost pórů je v jednotkách až desítkách mikrometrů. Homogenita struktury je narušována kulovitými útvary. Rozdíl mezi trojrozměrnou a dvojrozměrnou strukturou je z uvedených snímků zřejmý.



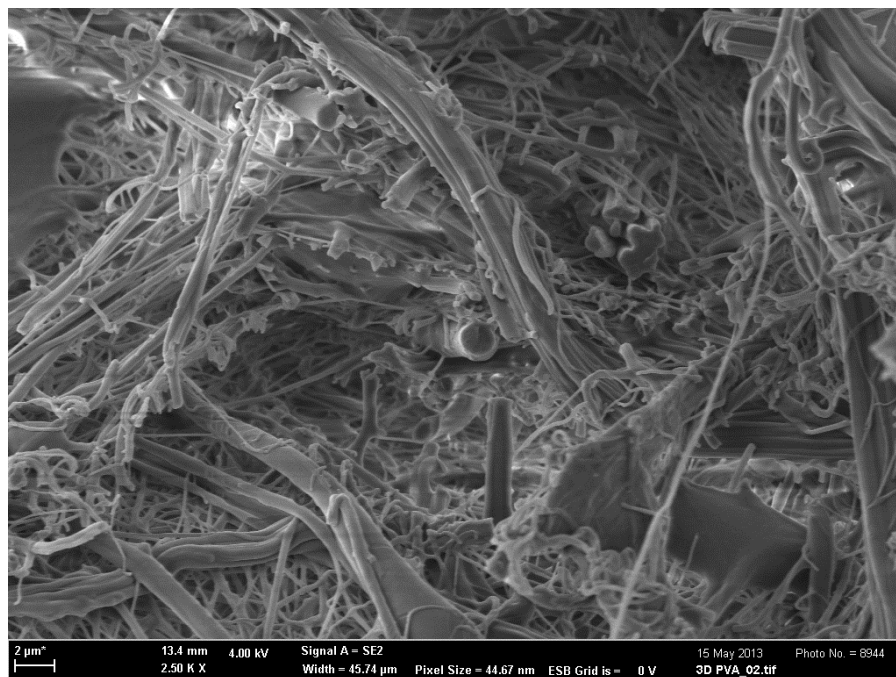
Obr. 34 Polykaprolakton – dvojrozměrná vlákenná vrstva – vzorek B, ZEISS UltraPlus



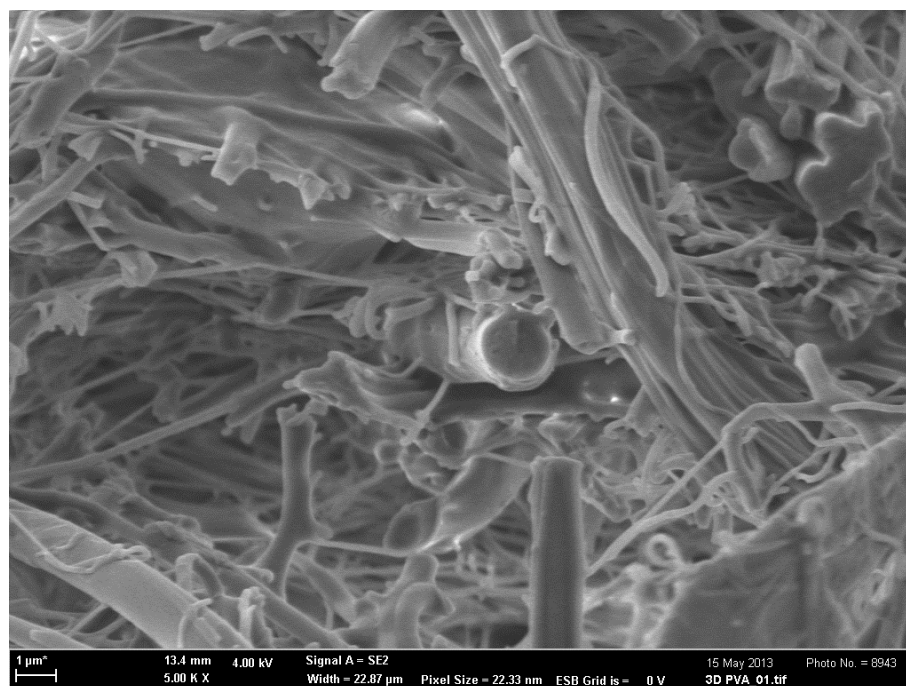
Obr. 35 Polykaprolakton – dvojrozměrná vlákenná vrstva – vzorek B, ZEISS UltraPlus



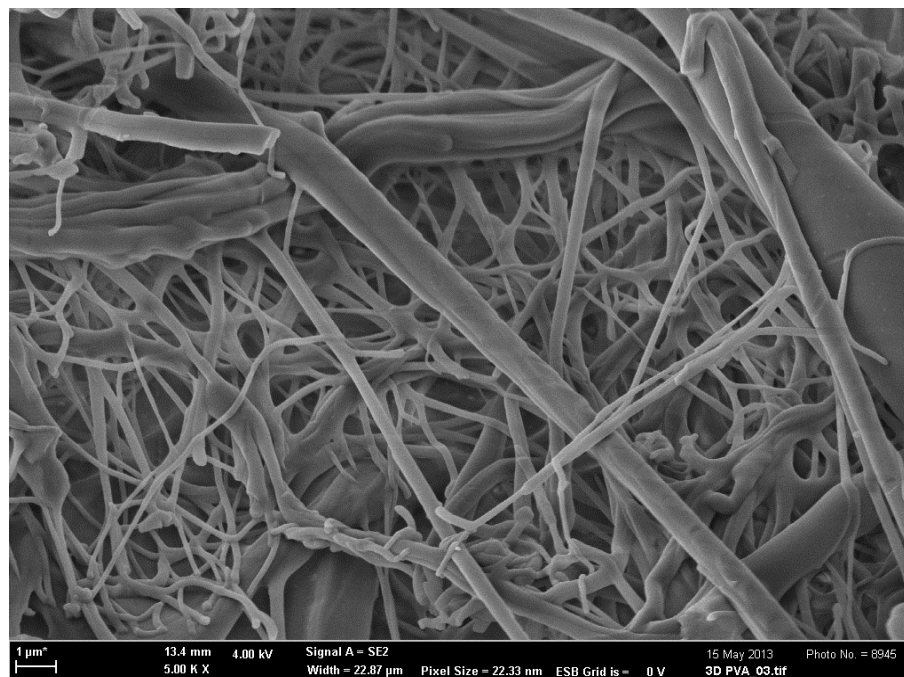
Obr. 36 Polykaprolakton – dvojrozměrná vlákenná vrstva – vzorek B, ZEISS UltraPlus



Obr. 37 Polyvinylalkohol – trojrozměrná vlákenná vrstva – vzorek C, ZEISS UltraPlus



Obr. 38 Polyvinylalkohol – trojrozměrná vlákenná vrstva – vzorek C, ZEISS UltraPlus

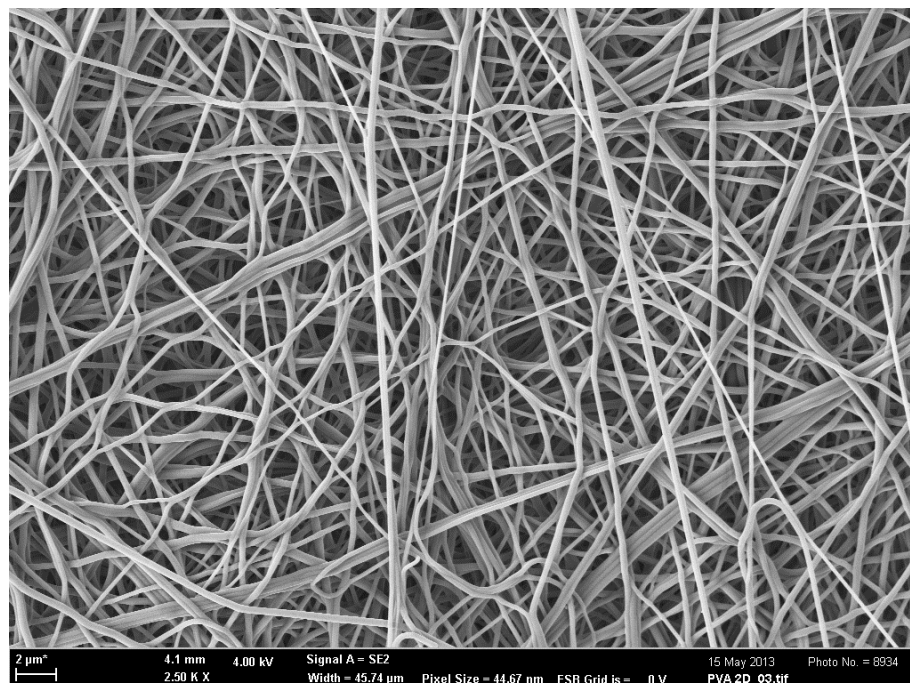


Obr. 39 Polyvinylalkohol – trojrozměrná vlákenná vrstva – vzorek D, ZEISS UltraPlus

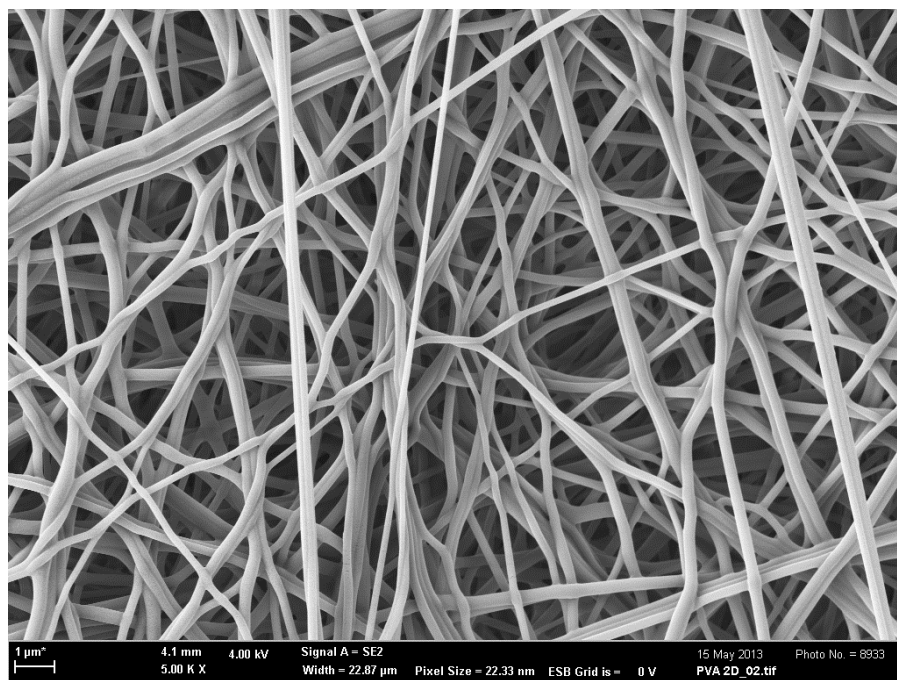
Vzorky C a D – obr. 37, 38, 39 představují vzorky trojrozměrné vlákenné vrstvy polyvinylalkoholu. Ze snímků z rastrovacího elektronového mikroskopu je vidět, že i v tomto případě trojrozměrná vrstva představuje soubor vláken mikrometrových, submikrometrových a nanometrových rozměrů. Část vláken jeví jistou uspořádanost, která může být způsobena jak primárním způsobem výroby vlákenné struktury, tak sekundárně – přípravou vzorků pro mikroskopické pozorování – lomy vlákenné struktury v kapalném dusíku. Vlákná se ve struktuře vrstvy kříží, což opět pravděpodobně souvisí se způsobem jejich výroby. Vzájemným nahodilým uspořádáváním vláken je tak vytvářena prostorová struktura. Volné prostory mezi vlákny je možné považovat za velmi malé, vlákna jsou uspořádána těsně, póry jsou v jednotkách mikrometrů.

Také v případě polyvinylalkoholu – obr. 40, 41, 42 byly pro doplňující informace ke studiu trojrozměrné struktury pořízeny snímky dvojrozměrné struktury – vzorky E. V této struktuře se nacházejí vlákna submikrometrových až nanometrových rozměrů, která jsou náhodně propletena tak, že vytváří porézní strukturu. Velikost pórů

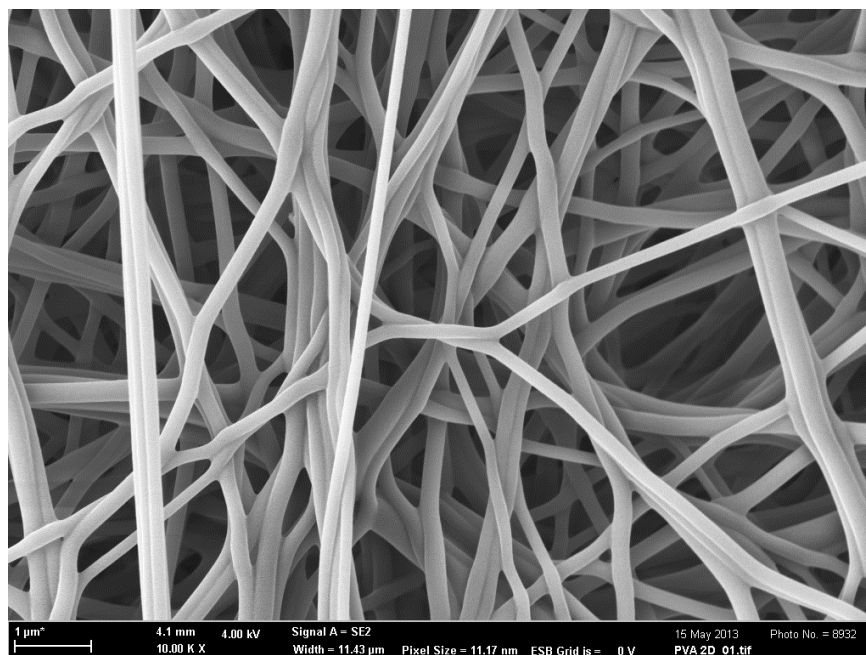
je v jednotkách mikrometrů. Homogenita struktury je na rozdíl od trojrozměrné struktury vysoká. Rozdíl mezi trojrozměrnou a dvojrozměrnou strukturou je z uvedených souborů snímků zřejmý.



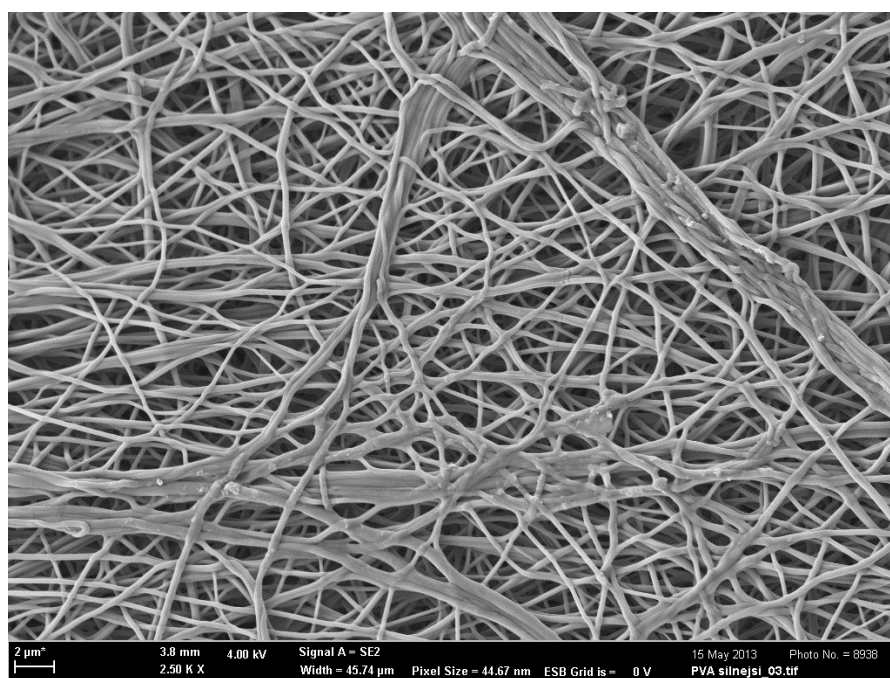
Obr. 40 Polyvinylalkohol – dvojrozměrná vlákenná vrstva – vzorek E, ZEISS UltraPlus



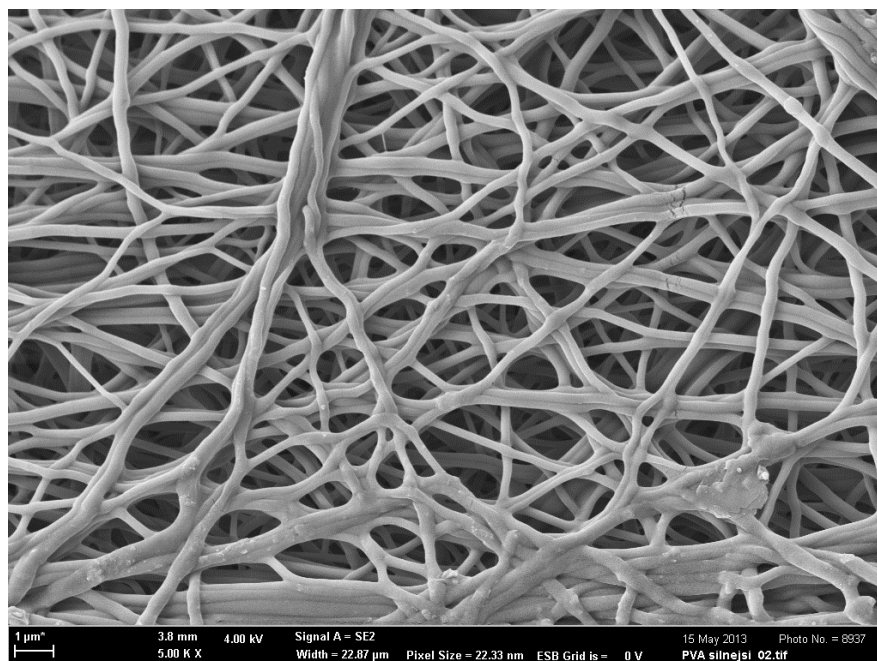
Obr. 41 Polyvinylalkohol – dvojrozměrná vlákenná vrstva – vzorek E, ZEISS UltraPlus



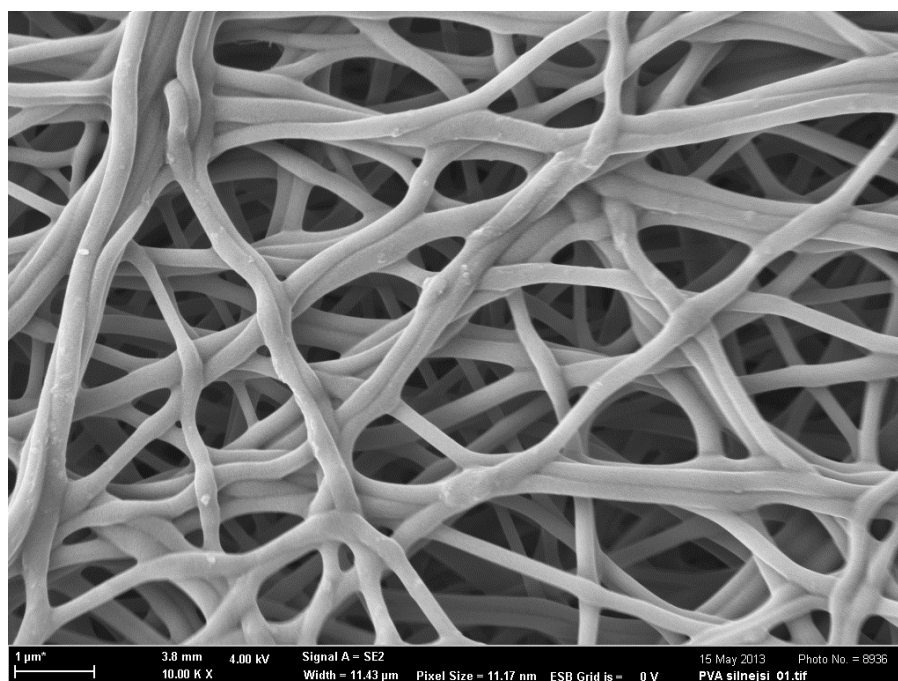
Obr. 42 Polyvinylalkohol – dvojrozměrná vlákenná vrstva – vzorek E, ZEISS UltraPlus



Obr. 43 Polyvinylalkohol – dvojrozměrná vlákenná vrstva – vzorek F, ZEISS UltraPlus



Obr. 44 Polyvinylalkohol – dvojrozměrná vlákenná vrstva – vzorek F, ZEISS UltraPlus



Obr. 45 Polyvinylalkohol – dvojrozměrná vlákenná vrstva – vzorek F, ZEISS UltraPlus

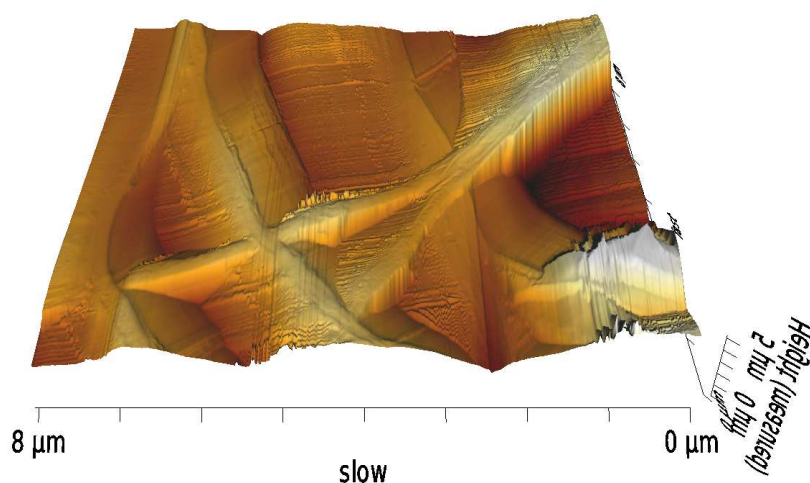
V případě polyvinylalkoholu byly pořízeny snímky silnější dvojrozměrné struktury – vzorky F – obr. 43, 44, 45, jejíž vlastnosti by se teoreticky mohly blížit vlastnostem trojrozměrné struktury. V této struktuře se nacházejí převážně vlákna sub -

mikrometrových rozměrů, která jsou náhodně propletena tak, že vytváří porézní strukturu. Velikost pórů jsou v jednotkách mikrometrů. I tato struktura vykazuje vyšší homogenitu než původní struktura trojrozměrná.

Z výsledků hodnocení vzorků je patrný rozdíl mezi trojrozměrnými a dvojrozměrnými vlákennými strukturami a to v případech obou polymerních materiálů. Využití rastrovacího elektronového mikroskopu se v oblasti studia struktur tohoto typu jeví jako vhodné a efektivní.

2. 3. 2 Mikroskopie atomárních sil

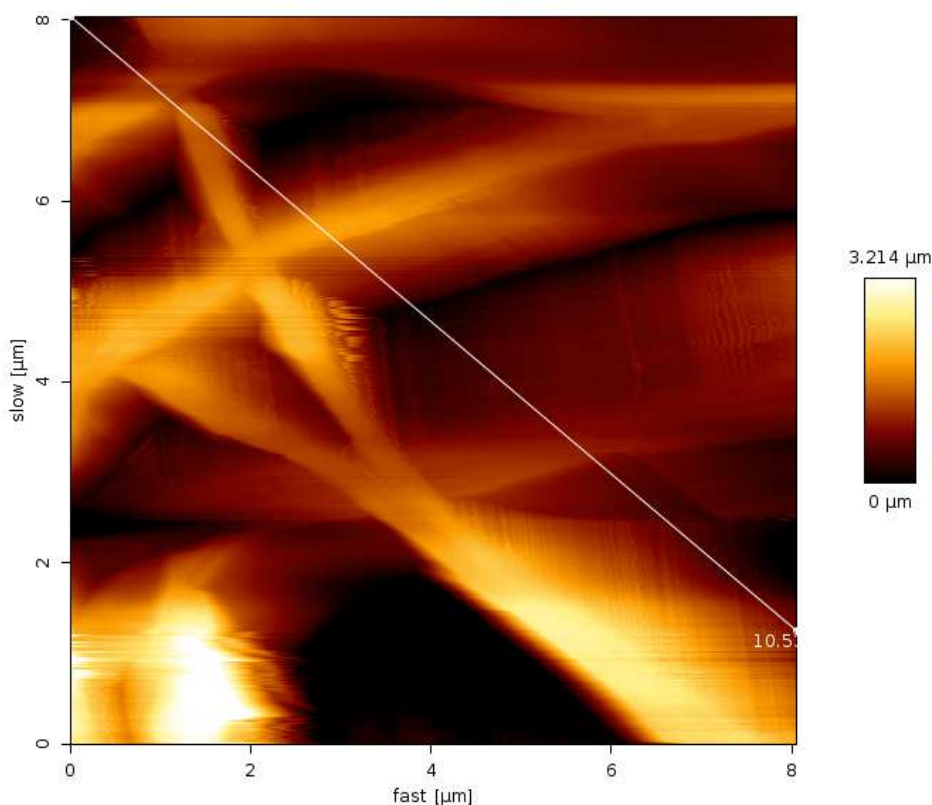
Ke studiu trojrozměrných vlákenných struktur byl využit i mikroskop atomárních sil (AFM). Vzorky nemusely být před vlastním pozorováním nijak upravovány. Specifikem mikroskopie atomárních sil je zkoumání povrchu vzorku – v tomto případě zejména povrchové porozity vláken. Následující modely povrchů vlákenných struktur ukazují možnosti zobrazení touto analytickou metodou. Pro porovnání k povrchům trojrozměrných vlákenných struktur byly vytvořeny i modely dvojrozměrných vlákenných struktur pro oba materiálové typy vlákenných vzorků.



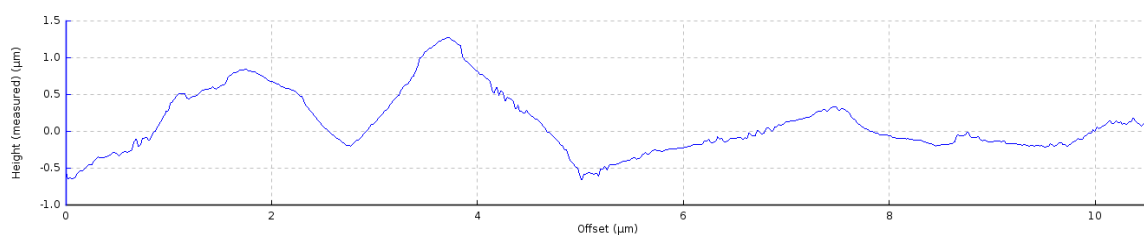
Obr. 46 Polykaprolakton – trojrozměrná vlákenná vrstva – vzorek A, JPK NanoWizard III

Model povrchu trojrozměrné vlákenné struktury polykaprolaktonu – obr. 46 byl vytvořen z vybrané analyzované plochy vzorku o rozměrech $8 \times 8 \mu\text{m}$. Z modelu je možné usuzovat na průměry vzájemně se dotýkajících nebo křížících se vláken, jejich uspořádání a výšku (tloušťku) zobrazované vrstvy.

Z následujících dvou obrázků – obr. 47 a 48 je vidět stanovení drsnosti povrchu na vybraném úseku. Na modelu ani z číselného vyjádření naměřené drsnosti není vidět, že by vlákna vykazovala další povrchovou strukturu – povrchové póry. Nestability na naměřené křivce drsnosti souvisí s přesností měření přístroje a také podmínkami, za kterých bylo měření prováděno (nežádoucí vibrace při vysokém rozsahu a rozlišení).

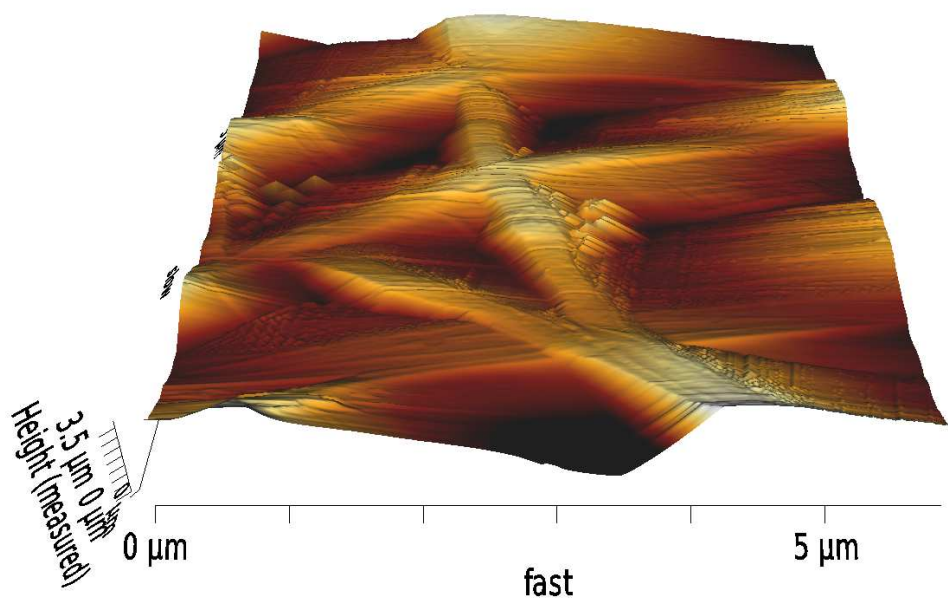


Obr. 47 Polykaprolakton – trojrozměrná vlákenná vrstva – vzorek A, stanovení drsnosti povrchu vzorku, JPK NanoWizard III



Minimum in Z-Range	-662 nm
Maximum in Z-Range	1271 nm
Length of Line	10.53 μm
Average Roughness Ra	334.1 nm
RMS Roughness Rq	418.0 nm
Peak-to-Valley Roughness Rt	1.933 μm

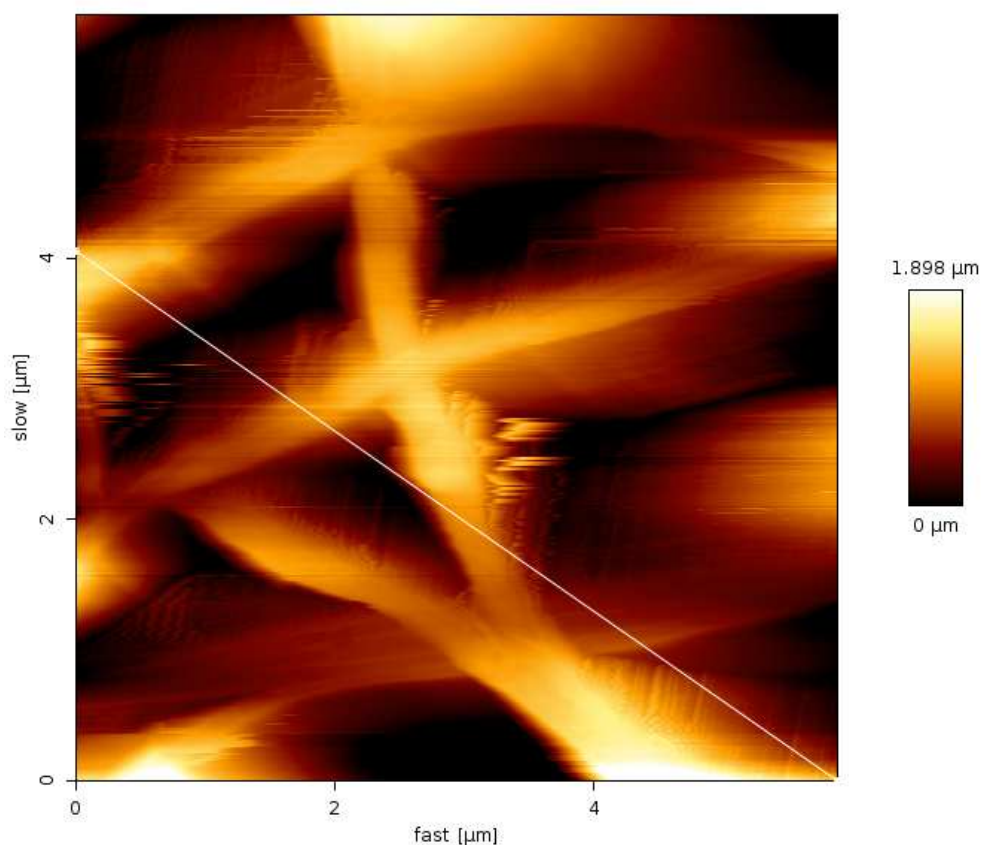
Obr. 48 Polykaprolakton – trojrozměrná vlákenná vrstva – vzorek A, číselné vyjádření drsnosti sledovaného povrchu, JPK NanoWizard III



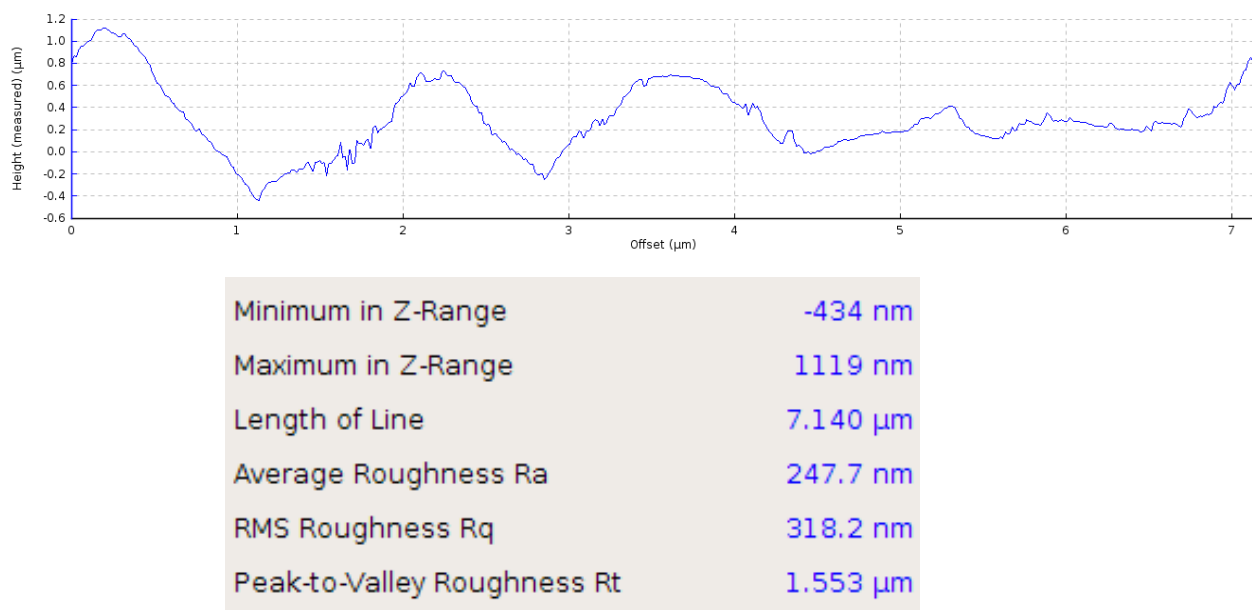
Obr. 49 Polykaprolakton – dvojrozměrná vlákenná vrstva – vzorek B, JPK NanoWizard III

Model povrchu dvojrozměrné vlákenné struktury polykaprolaktonu – obr. 49 byl vytvořen z vybrané analyzované plochy vzorku o rozměrech $6 \times 6 \mu\text{m}$. Z modelu je možné usuzovat na průměry vzájemně se dotýkajících nebo křížících se vláken. Namodelovaný povrch vláken není hladký – šum mohl být způsobený podmínkami měření.

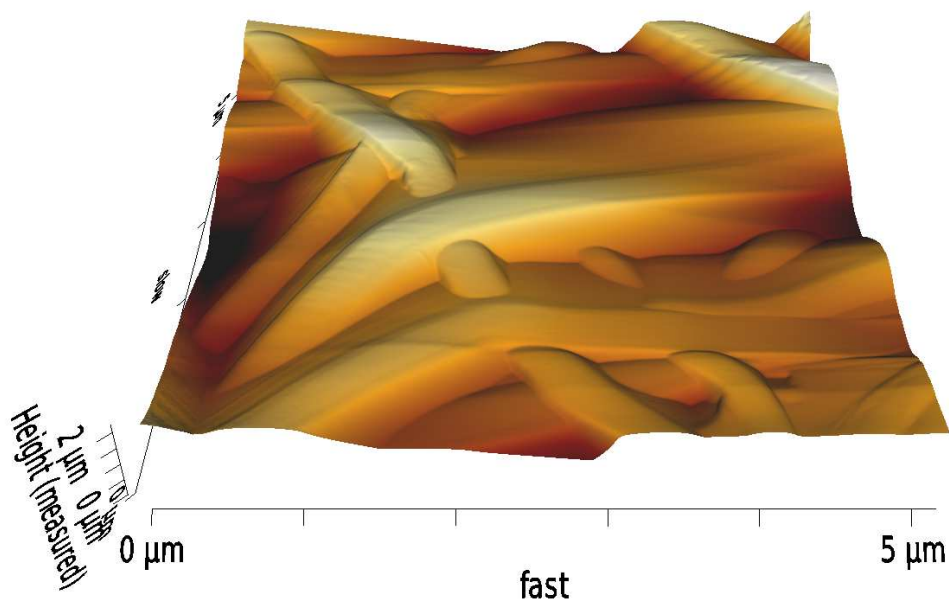
Z následujících dvou obrázků – obr. 50 a 51 je opět vidět stanovení drsnosti povrchu na vybraném úseku. Na modelu a ani z číselného vyjádření naměřené drsnosti není vidět, že by vlákna vykazovala další povrchovou strukturu – povrchové póry. Nestability na naměřené křivce drsnosti souvisí s přesností měření přístroje a také podmínkami, za kterých bylo měření prováděno (vibrace).



Obr. 50 Polykaprolakton – dvojrozměrná vlákenná vrstva – vzorek B, stanovení drsnosti povrchu vzorku, JPK NanoWizard III



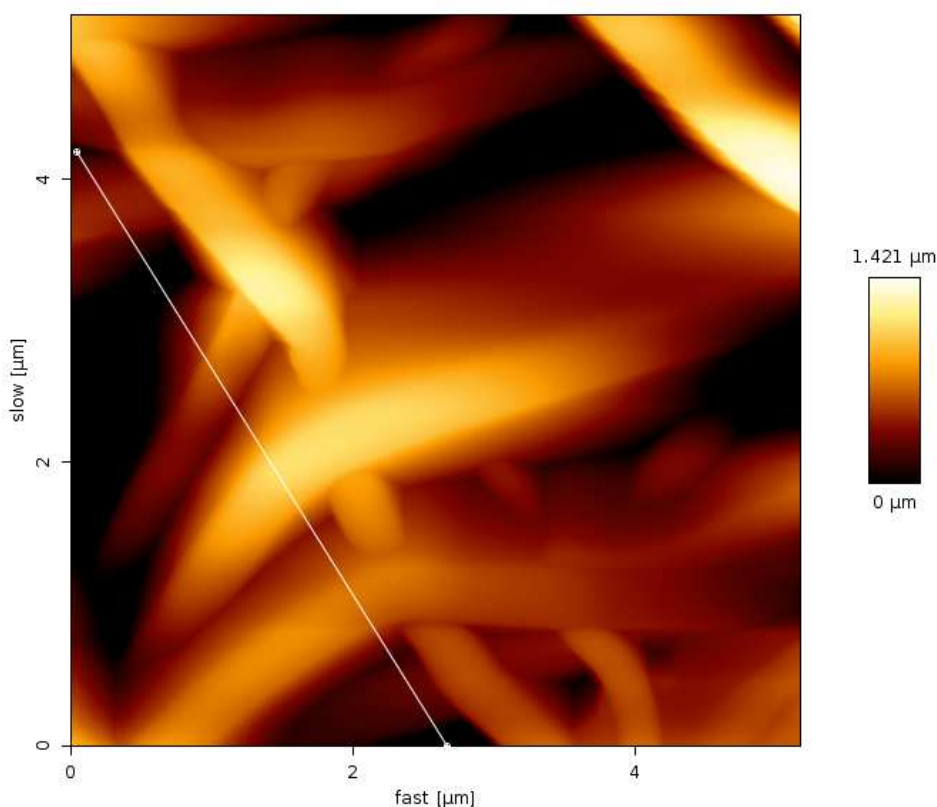
Obr. 51 Polykaprolakton – dvojrozměrná vlákenná vrstva – vzorek B, číselné vyjádření drsnosti sledovaného povrchu, JPK NanoWizard III



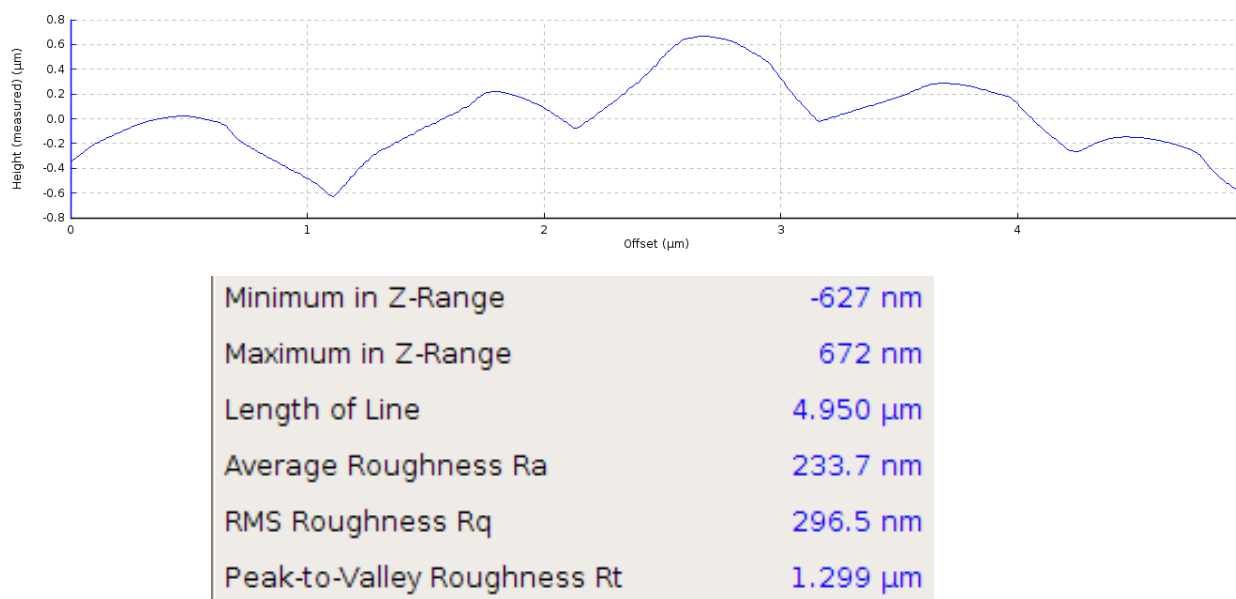
Obr. 52 Polyvinylalkohol – trojrozměrná vlákenná vrstva – vzorek C, JPK NanoWizard III

Model povrchu trojrozměrné vlákenné struktury polyvinylalkoholu – obr. 52 byl vytvořen z vybrané analyzované plochy vzorku o rozměrech $5 \times 5 \mu\text{m}$. Z modelu je možné usuzovat na průměry vzájemně se dotýkajících nebo křížících se vláken. Na rozdíl od vlákenné struktury polykaprolaktonu se tento model jeví jako lépe zpracovaný. Obraz jednotlivých vláken je lépe viditelný, bez povrchových vad a šumů. Z obrázku by se zdálo, že jednotlivá křížící se vlákna sebou vzájemně prostupují, což je technologicky nemožné a tento model struktury je tedy neodpovídá skutečnému stavu struktury.

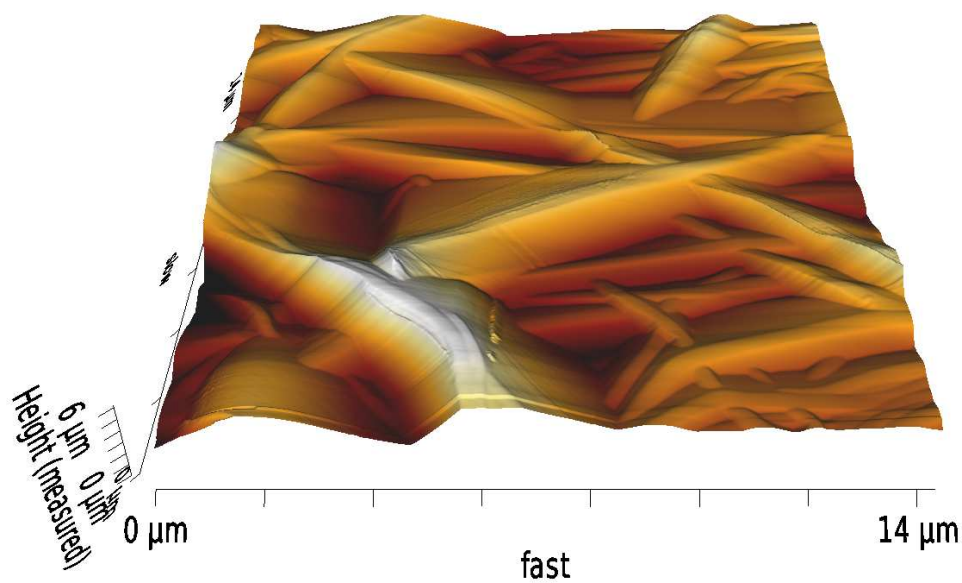
Z následujících dvou obrázků – obr. 53 a 54 je opět vidět stanovení drsnosti povrchu na vybraném úseku. Na modelu a ani z číselného vyjádření naměřené drsnosti není vidět, že by vlákna vykazovala další povrchovou strukturu – povrchové póry.



Obr. 53 Polyvinylalkohol – trojrozměrná vlákenná vrstva – vzorek C, stanovení drsnosti povrchu vzorku, JPK NanoWizard III



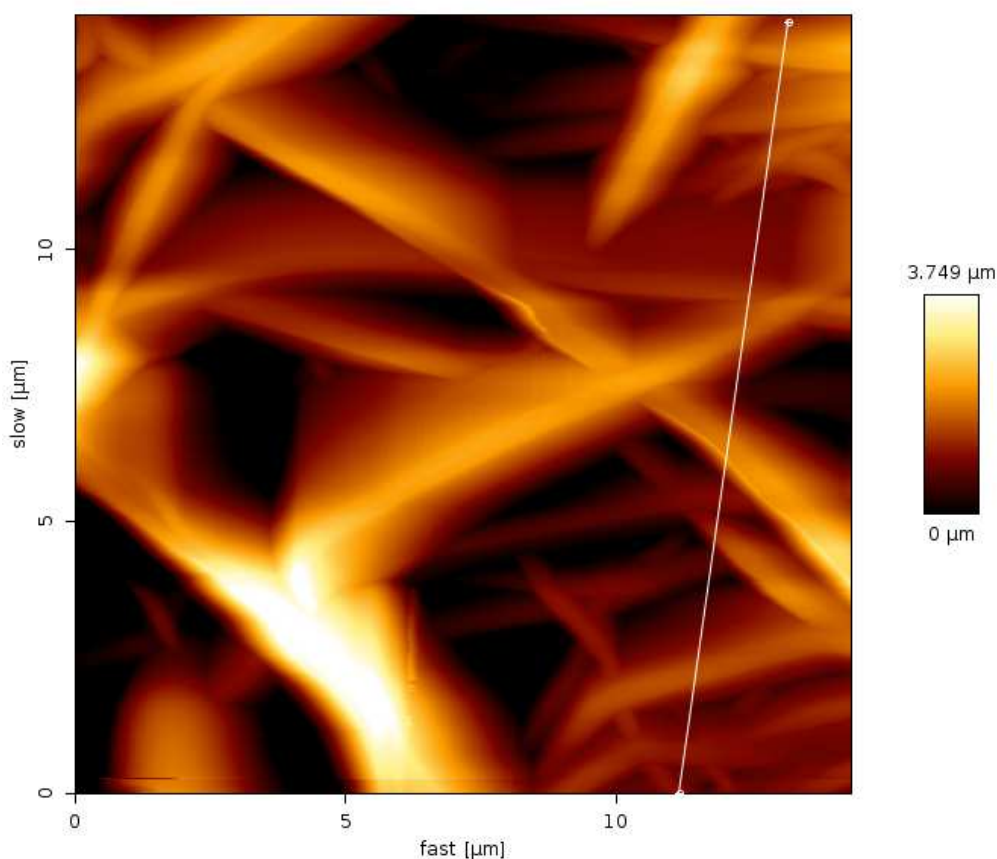
Obr. 54 Polyvinylalkohol – trojrozměrná vlákenná vrstva – vzorek C, číselné vyjádření drsnosti sledovaného povrchu, JPK NanoWizard III



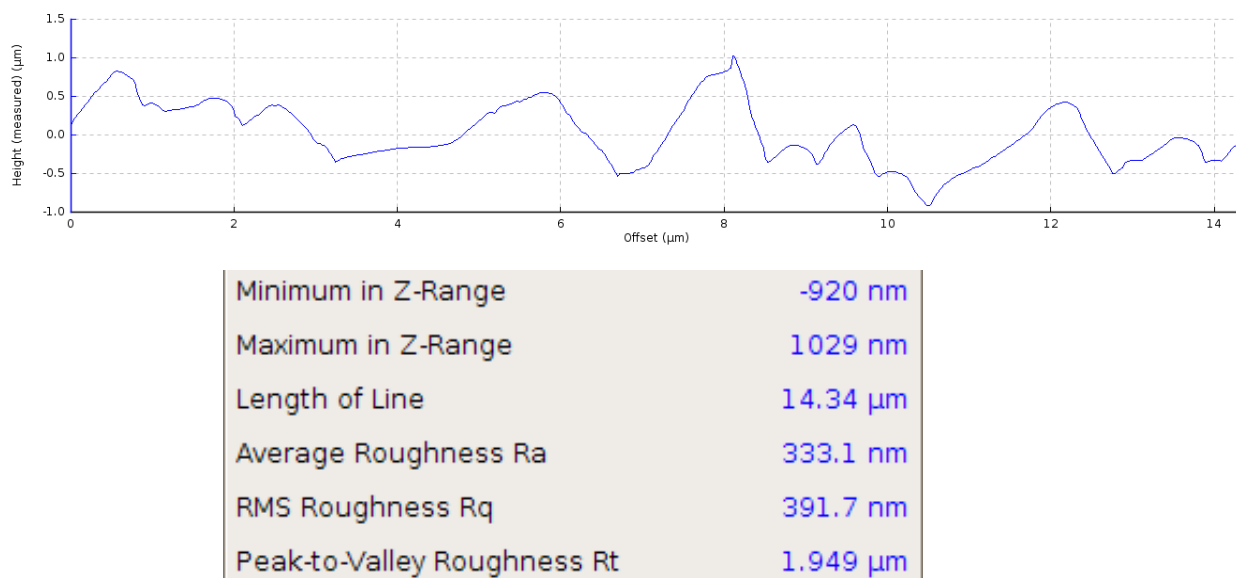
Obr. 55 Polyvinylalkohol – dvojrozměrná vlákenná vrstva – vzorek E, JPK NanoWizard III

Model povrchu dvojrozměrné vláknenné struktury polyvinylalkoholu – obr. 55 byl vytvořen z vybrané analyzované plochy vzorku o rozměrech $14 \times 14 \mu\text{m}$. Z modelu je možné usuzovat na průměry vzájemně se dotýkajících nebo křížících se vláken, které se pohybují v rozsahu rozměrů mikrometrových i submikrometrových. Z obrázku se zdá, že jednotlivá křížící se vlákna sebou vzájemně prostupují, což je technologicky nemožné. Na rozdíl od předešlých modelů je v tomto případě patrné lepší zobrazení rozměrů vláken a jejich prostorové uspořádání.

Z následujících dvou obrázků – obr. 56 a 57 je opět vidět stanovení drsnosti povrchu na vybraném úseku. Na modelu a ani z číselného vyjádření naměřené drsnosti není vidět, že by vlákna vykazovala další povrchovou strukturu – povrchové póry.



Obr. 56 Polyvinylalkohol – dvojrozměrná vláknenná vrstva – vzorek E, stanovení drsnosti povrchu vzorku, JPK NanoWizard III



Obr. 57 Polyvinylalkohol – dvojrozměrná vlákenná vrstva – vzorek E, číselné vyjádření drsnosti sledovaného povrchu, JPK NanoWizard III

3. Diskuse výsledků

Vlákenná trojrozměrná struktura obou studovaných materiálů – polykaprolaktonu a polyvinylalkoholu byla připravena na TUL metodou elektrostatického zvlákňování s využitím strukturovaného kolektoru.

Připravená vlákenná struktura měla být hodnocena z hlediska průměrů vláken, rozložení vláken, volných prostor mezi vlákny – parametrů důležitých pro následné osídlení vlákenných struktur buňkami. Zhodnocení struktury současně slouží k posouzení vhodnosti materiálu použitého k přípravě vzorků trojrozměrných vláknových struktur stejně jako technologických parametrů výroby. Pro hodnocení uvedených parametrů bylo zapotřebí připravit vhodné vzorky.

Pro přípravu vzorků byly použity následující postupy:

- Zalití trojrozměrné vlákenné vrstvy polykaprolaktonu a polyvinylalkoholu do technického Dentacrylu a příprava příčných řezů bylo nevyhovující, v případě vlákenné struktury z polykaprolaktonu nedošlo k prosycení vzorků pryskyřicí, v případě polyvinylalkoholu se struktura v pryskyřici rozpustila.
- Zalití vzorků trojrozměrných vlákenných struktur do Epon-Durcupanu bylo neúspěšné, neboť se oba materiály v pryskyřici rozpustily a na skenovacím elektronovém mikroskopu nebyla patrná žádná vlákenná struktura.
- Samostatné řezy trojrozměrných vlákenných vrstev obou materiálů se ukázaly jako neúspěšné, při řezání žiletkou docházelo k deformaci vlákenné struktury a nebylo dosaženo požadovaného efektu – možnosti sledování rozložení vláken, rozměrů vláken, hustoty rozložení vláken a dutin (pórů) ve struktuře. Na skenovacím elektronovém mikroskopu byla vidět pouze zdeformovaná vlákenná struktura.
- Dalším způsobem přípravy vzorků byla technika řezání trojrozměrné vlákenné struktury kontinuálním laserem, která byla nevhodná, neboť u vlákenných struktur z obou typů materiálů došlo působením paprsku k tepelnému porušení jednotlivých vláken a vzorky se roztavily a seškvařily.
- Jako vhodná se jevila pouze metoda lámání vzorků v kapalném dusíku. Vzorky trojrozměrných vlákenných struktur obou materiálů byly v pinzetách umístěny do nádoby s kapalným dusíkem, ochlazeny po dobu 1 minuty a zlomeny. K lomu vzorků však došlo pouze v případě polykaprolaktonu, v případě polyvinylalkoholu k lomu vzorků nedošlo a následně pozorované vzorky byly získány jeho rychlým přetržením.

Pro hodnocení připravených vzorků byly použity vybrané mikroskopické techniky:

- Rastrovací elektronová mikroskopie byla využita k zobrazení trojrozměrných a pro porovnání i dvojrozměrných vlákenných struktur obou testovaných materiálů – polykaprolaktonu i polyvinylalkoholu. Z výsledků těchto hodnocení je zřejmé, že rastrovacím elektronovým mikroskopem lze

získat požadované informace o průměrech vláken, rozložení vláken, volných prostorech mezi vlákny – pórech a o případné orientaci vláken. Při dostatečném zvětšení je možné sledovat i povrchovou porozitu vláken.

- Mikroskopie atomárních sil byla využita ke sledování povrchu vzorku – v tomto případě zejména možné povrchové porozity vláken. Z modelů vytvořených na základě snímání povrchu vláken se zdá, že jednotlivá křížící se vlákna sebou vzájemně prostupují, což je technologicky nemožné a tento model struktury tedy neodpovídá skutečnému stavu struktury.
- Transmisní elektronová mikroskopie nebyla využita v důsledku toho, že nebylo technicky možné připravit vzorky požadovaných parametrů.

4. Závěr

Cílem bakalářské práce bylo seznámit se s problematikou trojrozměrných vlákenných vrstev a to zejména z hlediska analýzy jejich struktur. Rešerše byla vypracována na požadované téma a dále orientována na problematiku využití vlákenných vrstev v oblasti medicíny, konkrétně v oblasti tkáňového inženýrství. Byly popsány základní požadavky kladené na tkáňové nosiče – tzv. scaffoldy, dále byla stručně vysvětlena problematika biokompatibility a biodegradability, které jsou pro materiály tohoto typu podstatné. V dalších kapitolách byly uvedeny základní typy materiálů využitelných pro přípravu těchto vrstev, základní technologický postup – elektrostatické zvlákňování, které je pro výrobu těchto struktur nejvyužívanější a principy nejpoužívanějšího způsobu hodnocení těchto struktur – mikroskopie.

V experimentální části práce byly navrženy postupy, jejichž cílem bylo získat vhodné vzorky vlákenných vrstev v příčném řezu, které měly být dále analyzovány mikroskopicky. Byly provedeny příčné řezy vlákenných vrstev zalitých v akrylátové pryskyřici, v epon-durcupanové pryskyřici, byly provedeny řezy žiletkou i řezy mikrotomem, bylo testováno řezání vzorků laserem i lomy vlákenných vzorků v kapalném dusíku. Jediným použitelným způsobem přípravy vzorků byly lomy vlákenných vrstev v kapalném dusíku.

Zlomené vzorky byly dále podrobeny mikroskopické analýze s využitím rastrovací elektronové mikroskopie a mikroskopie atomárních sil. Rastrovací elektronová mikroskopie byla využita jak k získání přehledného obrazu o vlákenné struktuře, tak k informacím o průměrech vláken, rozložení vláken, orientaci vláken a o velikosti volných prostor mezi vlákny – pórů. Mikroskopie atomárních sil byla využita k podrobnější analýze povrchů vláken – k jejich drsnosti. Transmisní elektronová mikroskopie nebyla využita v důsledku toho, že nebylo možné připravit vzorky požadovaných parametrů.

Na základě provedených experimentů lze výsledky práce shrnout do následujících bodů:

- Jediný způsob, který vedl k přípravě vzorků pro následné hodnocení mikroskopickými technikami, byl lom vzorků v kapalném dusíku.
- Rastrovací elektronový mikroskop je nejvhodnější technikou k dosažení objektivních výsledků z hlediska posouzení průměrů vláken, jejich rozložení, orientace a velikostí volných prostor mezi vlákny – pórů.
- Mikroskop atomárních sil je využitelný, ale modely, které vznikají na základě této analýzy, mohou být zavádějící.
- K posouzení technologie přípravy vlákenných vrstev a zhodnocení jejich parametrů je vhodné využít vzorků, které budou lámány v kapalném dusíku a hodnoceny s využitím rastrovacího elektronového mikroskopu.

Literatura

- [1] AMLER, E. et. al.: *Lékařské textilie 1*. AIP, Praha, 2008.
- [2] LIU, C., XIA, Z., CZERNUSZKA, J. T.: *Design and development of three dimensional scaffold for tissue engineering*. Chemical Engineering Research and Design, Vol. 85, No. 7. , 2007.
- [3] EBERLI, D.: *Tissue engineering*. Rijeka, Croatia: Intech, 2010. ISBN 978-953-3070-797.
- [4] LUKAS, D. et. al.: *Lékařské textilie 2*. AIP, Praha 2008.
- [5] VOKURKA, M., HUGO, J. a kol.: *Velký lékařský slovník, 8. vydání*. Maxdorf, Praha, 2009. ISBN 978-80-7345-166-0
- [6] LABET, M., THIELEMANS, W.: *Synthesis of polycaprolactone: a review*. Chemical Society Reviews, 2009, 38, 3484-3504.
- [7] KROISOVÁ, D.: *Biodegradovatelné polymery: úvod do problematiky*. Vyd. 1. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2009. str. 33, ISBN 978-80-7372-468-9.
- [8] KREBSOVÁ, M.: *Nauka o polymerech*. Vyd. 1. Liberec: Vysoká škola strojní a textilní v Liberci, 1978. str. 166-167, ISBN 55-814-78.
- [9] Setkání středoškolských studentů [online]
<http://www1.fs.cvut.cz/stretech/2012/sbornik/31.pdf> [citováno 18. 5. 2013].
- [10] Z projektu Wikimedia Commons [online]
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Roller_electrospinning.jpg [citováno 15. 5. 2013].
- [11] PLUHAŘ, J. a kol: *Nauka o materiálech*. SNTL, Praha 1989, p. 90-100. ISBN 04-205-89.
- [12] NAVRÁTIL, L., ROSINA, J. a kol.: *Medicínská biofyzika*. GRADA Publishing a. s., Praha, 2005. ISBN 80-247-1152-4.
- [13] [online] http://www.google.cz/search?aq=&hl=en&rlz=1T4SNYK_en-GBCZ323CZ325&q=scanning+electron+microscopy&um=1&ie=UTF-8&tbm=isch&source=og&sa=N&tab=wi&ei=FNOMUcGmMMzZsgbXhYCoD

- A&biw=1254&bih=599&sei=INOMUcDmFI-Mswa784HwBg#imgrc=W66m7g6boaxTdM%3A%3BfFK7CdduFfcEwM%3Bhttp%253A%252F%252Fwww.purdue.edu%252Frem%252Frs%252Fgraphics%252Fsem2.gif%3Bhttp%253A%252F%252Fwww.purdue.edu%252Frem%252Frs%252Fsem.htm%3B368%3B553 [citováno 13. 5. 2013]
- [14] [online] <http://www.texample.net/tikz/examples/scanning-electron-microscopy/> [citováno 13. 5. 2013]
- [15] WILLIAMS, D. B., CARTER, C. B.: *Transmissions Electron Microscopy: a textbook for materiál science*. Plenum Press, New York , 1996.
- [16] KALINA, T., POKORNY, V.: *Základy elektronové mikroskopie pro biology*. Universita Karlova, Praha, 1981.
- [17] [online] http://www.google.cz/search?q=TEM&hl=en-GB&rlz=1T4SNYK_en-GBCZ323CZ325&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ei=pNqMUbf8A8WftAao4IGICA&ved=0CEYQsAQ&biw=1254&bih=599#imgrc=xrqaasIwKMhdqM%3A%3B4gcWPwB_zSM4ZM%3Bhttp%253A%252F%252Fwww.hk-phy.org%252Fatomic_world%252Ftem%252Fimages%252Ffig04.gif%3Bhttp%253A%252F%252Fwww.hk-phy.org%252Fatomic_world%252Ftem%252Ftem02_e.html%3B373%3B500 [citováno 11. 5. 2013]
- [18] KUBÍNEK, R., VÚJTEK, M., MAŠLÁŇ, M.. *Mikroskopie skenující sondou*. 1. vyd. Univerzita Palackého, Olomouc, 2003, 145 s. ISBN 80-244-0602-0.
- [19] [online]http://www.google.cz/search?aq=&hl=en&rlz=1T4SNYK_en-GBCZ323CZ325&q=atom+force+microscopy&um=1&ie=UTF-8&tbm=isch&source=og&sa=N&tab=wi&ei=s9eMUZnbN4bOswb2yIC4AQ&biw=1254&bih=599&sei=tteMUcrGN4GxtAavxYCoAg#imgrc=vS0cf-cQMDB3cM%3A%3BqNmP5o6NteHIUM%3Bhttp%253A%252F%252Fwww.geobacter.org%252Fimages%252Fjpg%252FAFM_diagram.jpg%3Bhttp%253A%252F%252Fwww.geobacter.org%252FNanowires%3B1000%3B750 [citováno 12. 5. 2013]
- [20] [online] http://www.google.cz/search?aq=&hl=en&rlz=1T4SNYK_en-GBCZ323CZ325&q=atom+force+microscopy&um=1&ie=UTF-8&tbm=isch&source=og&sa=N&tab=wi&ei=s9eMUZnbN4bOswb2yIC4AQ&biw=1254&bih=599&sei=DdiMUbuxGcGitAaCqICoDA#imgrc=RMQrNDF2L0FwxM%3A%3BUAVHhlo-

GO1UUM%3Bhttp%253A%252F%252Fwww.nisenet.org%252Fsites%252Fdefault%252Ffiles%252Fimages%252FAFM-med.jpg%3Bhttp%253A%252F%252Fwww.nisenet.org%252Fnode%252F3449%3B380%3B386 [citováno 10. 5. 2013]

- [21] LUKÁŠ, D.: *Stereologie textilních materiálů*. Technická universita v Liberci, Fakulta textilní, 1999. ISBN 80-7083-362-9
- [22] KALOUS, T.: *Výroba nanopřízí pomocí speciálních kolektorů*. Bakalářská práce, Technická univerzita v Liberci, Fakulta textilní – Katedra netkaných textilií, 2011.
- [23] [online] http://www.ft.tul.cz/depart/knt/nanotex/5.%20prednaska%20TNA_kombinovane%20studium%20LS%20šk.rok%202009-10_Eva%20Kostakova,%20KNT,%20FT,%20TUL.pdf [citováno 5. 5. 2013]
- [24] [online] <http://www.spofadental.com/CZ/produkty/technicke-materialy/metylmetakrylatova-lici-pryskyrice/dentacryl-technicky/productfamily/Dentacryl> [citováno 1. 5. 2013]
- [25] [online] http://www.med.muni.cz/histol/MedAtlas_2/HP_txt8-2-2-2.htm [citováno 10. 5. 2013]